

PARIS

Série U

485

T H E S E

PRESENTÉE

À LA FACULTE DE PHARMACIE  
DE L'UNIVERSITE DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS  
MENTION PHARMACIE

PAR

Nicole JULLIEN - SAINT GUILY

ETUDE DU TRANSPORT DES COMPOSES MERCURIELS  
PAR LES PROTEINES SERIQUES

Soutenue le 30 Juin 1970 devant la Commission d'Examen

MM. G. VALETTE

Président

Y. COHEN

Examineurs

F. ROUSSELET



**T H E S E**

**PRESENTEE**

**A LA FACULTE DE PHARMACIE  
DE L'UNIVERSITE DE PARIS**

**POUR OBTENIR**

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE PARIS  
MENTION PHARMACIE**

**PAR**

**Nicole JULLIEN - SAINT GUILY**

**ETUDE DU TRANSPORT DES COMPOSES MERCURIELS  
PAR LES PROTEINES SERIQUES**

Soutenue le 30 Juin 1970 devant la Commission d'Examen

**MM. G. VALETTE**

**Président**

**Y. COHEN**

**Examineurs**

**F. ROUSSELET**

# PERSONNEL DE LA FACULTE DE PHARMACIE DE PARIS

## ADMINISTRATION

|      |                 |     |                                                  |
|------|-----------------|-----|--------------------------------------------------|
| MM.  | MALANGEAU P.    |     | DOYEN                                            |
|      | GUILLLOT M.     | 0 + | Assesseur                                        |
|      | DELAVERA P.     |     | Assesseur                                        |
| Mme  | RODINEAU L.     | +   | Secrétaire Général                               |
|      | FERRARI S.      |     | Attaché Principal d'Administration Universitaire |
|      |                 |     | Adjointe au Secrétaire Général                   |
| MM.  | BRENN A.        | +   | Attaché Principal d'Intendance Universitaire     |
|      | TRICAN J. N.    |     | Attaché Principal d'Administration Universitaire |
|      | JEANDEL L.      |     | Attaché d'Administration Universitaire           |
| Mme  | ESPINASSE M. L. |     | Attaché d'Administration Universitaire           |
| MM.  | JACOB           | +   | Attaché d'Administration Universitaire           |
| Mme  | MUR A. M.       |     | Attaché d'Administration Universitaire           |
| Mlle | FRIZOL E.       |     | Attaché d'Administration Universitaire           |

## DOYEN HONORAIRE

M. VALETTE Guillaume 0 +

## PROFESSEURS HONORAIRES

|     |           |     |
|-----|-----------|-----|
| MM. | LAUNOY L. | 0 + |
|     | FLEURY P. | 0 + |
|     | PICON M.  | 0 + |

## PROFESSEURS

|      |                 |     |                      |                                                          |
|------|-----------------|-----|----------------------|----------------------------------------------------------|
| MM.  | JANOT M. M.     | 0 + | Membre de l'Institut | Pharmacie Galénique (T)                                  |
|      | VALETTE G.      | 0 + |                      | Pharmacodynamie (T)                                      |
|      | PARIS R.        | 0 + |                      | Matière Médicale (T)                                     |
|      | GUILLLOT M.     | 0 + |                      | Physique (T)                                             |
| Mlle | GAUTIER J. A.   | 0 + |                      | Chimie Organique (T)                                     |
|      | LAMBIN S.       | +   |                      | Microbiologie (T)                                        |
|      | RAOUL Y.        | +   |                      | Physiologie (T)                                          |
|      | COURTOIS J.     | +   |                      | Chimie Biologique (T)                                    |
|      | DOMANGE L.      | 0 + |                      | Chimie Générale et Minérale (T)                          |
|      | TRUHAUT R.      | 0 + | Membre de l'Institut | Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)                  |
|      | MORETTE A.      | +   |                      | Hydrologie (T)                                           |
|      | CAVIER R.       | +   |                      | Parasitologie (T)                                        |
|      | QUEVAUVILLER A. | +   |                      | Hygiène et Education Sanitaire (T)                       |
|      | MOREAU R.       | +   |                      | Pharmacie Chimique (T)                                   |
|      | GERMAN A.       | +   |                      | Microbiologie (T)                                        |
|      | PIETTE M.       | +   |                      | Hématologie (T)                                          |
| MM.  | MALANGEAU P.    |     |                      | Chimie Analytique (T)                                    |
|      | GIRARD M.       | +   |                      | Biochimie Appliquée (T)                                  |
|      | DILLEMANN G.    |     |                      | Législation, Déontologie et Histoire de la Pharmacie (T) |
|      | DEYSSON G.      | +   |                      | Botanique (T)                                            |
|      | FLAHAUT J.      |     |                      | Minéralogie (T)                                          |
|      | RENAULT J.      |     |                      | Chimie Organique                                         |
|      | LE HIR A.       |     |                      | Pharmacie Galénique (T)                                  |
|      | BOUDENE C.      |     |                      | Toxicologie et Hygiène Industrielle (T)                  |
|      | LARUELLE P.     |     |                      | Physique (T)                                             |
|      | ROSSIGNOL P.    |     |                      | Pharmacodynamie (T)                                      |
|      | MANGEOT A.      |     |                      | Pharmacie Galénique Industrielle (T)                     |
|      | DELAVERA P.     |     |                      | Sémiologie et Pathologie Générale (T)                    |
|      | COHEN Y.        |     |                      | Pharmacodynamie (T)                                      |
|      | RENAULT H.      |     |                      | Physique                                                 |
|      | BOURDON R.      |     |                      | Chimie Analytique                                        |
|      | REYNAUD P.      |     |                      | Pharmacie Chimique                                       |
|      | LE MOAN R.      |     |                      | Toxicologie                                              |
|      | POISSON J.      |     |                      | Pharmacie Galénique                                      |
|      | MICHEL R.       |     |                      | Endocrinologie (T)                                       |
|      | LECLERC M.      |     |                      | Hématologie                                              |
|      | PERCHERON F.    |     |                      | Chimie Biologique                                        |
|      | SAVEL J.        |     |                      | Biologie Animale                                         |
|      | DESIGNES A.     |     |                      | Cryptogamie et Technique Bactériologique                 |

## MAITRES DE CONFERENCES

|      |                        |       |                                                         |
|------|------------------------|-------|---------------------------------------------------------|
| MM.  | PAOLETTI C.            |       | Toxicologie                                             |
|      | BORY J.                |       | Microbiologie                                           |
|      | MICQUE M.              |       | Chimie Organique                                        |
|      | GUIGNARD J. L.         |       | Botanique Générale                                      |
|      | GOUNELLE J. C.         |       | Physiologie                                             |
|      | BINET P.               |       | Biologie Animale                                        |
|      | COMBET FARNOUX C.      |       | Chimie Organique                                        |
|      | PLAT M.                |       | Chimie Analytique                                       |
| Mme  | PLAT M.                |       | Législation et Déontologie Pharmaceutique               |
| MM.  | DELAUCOUX E.           |       | Pharmacie Chimique                                      |
|      | CAVE A.                |       | Matière Médicale                                        |
|      | PUISIEUX F.            |       | Pharmacie Galénique                                     |
|      | DUCHON D'ENGELIERES M. |       | Chimie Organique                                        |
|      | ADOLPHE C.             |       | Physique                                                |
|      | GUERNET M.             |       | Chimie Analytique                                       |
|      | DIDRY J.               |       | Mathématiques Appliquées aux Sciences Expérimentales    |
|      | KHODADAD P.            |       | Chimie Minérale                                         |
|      | PERLES R.              |       | Chimie Biologique                                       |
|      | LEMONNIER A.           |       | Biochimie Appliquée                                     |
|      | YONGER J.              |       | Chimie Analytique                                       |
|      | HAMON M.               |       | Chimie Analytique                                       |
|      | MESTRE J.              |       | Botanique                                               |
|      | AGNERAY J.             |       | Biologie                                                |
|      | DREUX C.               |       | Biochimie Appliquée                                     |
|      | RIVET J.               |       | Chimie Générale et Minérale                             |
|      | ETIENNE J.             |       | Mathématiques                                           |
|      | HAZEBROUCQ G.          |       | Physique                                                |
|      | ROUSSELET F.           |       | Biochimie Appliquée                                     |
|      | BOURRINET P.           |       | Hygiène                                                 |
|      | SOULEAU Ch.            |       | Chimie Générale et Minérale                             |
| M.   | HENRY Jacques          | tit.  | Essais médicaments chimiques et galéniques              |
| Mme  | JULIEN Maud            | tit.  | ED Physique 2 A                                         |
| M.   | JULIEN René            | tit.  | ED Chimie Minérale 1 A                                  |
| Mlle | JUND Yvonne            | tit.  | CES Microbiologie et contrôle médicaments Microbiologie |
| M.   | LALEGERIE Pierre       | stag. | CES Biochimie                                           |
| M.   | LAROCHE Jacques        | tit.  | TP 5 A - Secourisme - Hygiène - Education Sanitaire     |
| Mme  | LEDUC Yvette           | tit.  | TP Chimie Analytique Qualitative                        |
| M.   | LEGENDRE Lucien        | dél.  | TP Chimie Organique 2 A                                 |
| Mme  | LEGER Nicole           | tit.  | Parasitologie 5 A                                       |
| M.   | LELUC Robert           | tit.  | CES Bactériologie                                       |
| M.   | LEMAZ René             | tit.  | CES Législation                                         |
| M.   | LEPAREUR Christian     | dél.  | Mathématiques                                           |
| Mme  | LE QUANG THUAN         | stag. | TP Chimie Analytique Qualitative                        |
| M.   | LEVILLAIN Pierre       | tit.  | ED Chimie Analytique Qualitative                        |

|      |                         |       |                                                 |
|------|-------------------------|-------|-------------------------------------------------|
| Mme  | LEVY Françoise          | dél.  | ED Botanique 2 A                                |
| M.   | LIKFORMAN Joseph        | tit.  | ED Physique 1 A                                 |
| Mlle | LONGEVILLE Monique      | tit.  | ED Botanique 1 A                                |
| M.   | MAHUZIER Georges        | tit.  | TP Chimie Analytique Quantitative               |
| M.   | MANDEREAU Jean          | tit.  | CES Pharmacotechnie Chimique                    |
| M.   | MANET Léon              | stag. | CES Biochimie                                   |
| M.   | MARTIN-FRERE Henri      | tit.  | TP Chimie Générale et Minérale 1 A              |
| Mme  | MAUGEN Yves             | dél.  | Mathématiques                                   |
| Mlle | MAYRARGUE Joëlle        | dél.  | ED Chimie Organique 1 - 2 A                     |
| Mlle | MICHELET Annick         | tit.  | ED Chimie Générale et Minérale 2 A              |
| M.   | MOULIN Pierre           | dél.  | TP Physique 1 A                                 |
| Mme  | MOURY Jacqueline        | stag. | TP Zoologie 1 A                                 |
| Mme  | NOTTEGHEM M. Jacqueline | tit.  | ED Parasitologie 4 A                            |
| M.   | NGUYEN Phu Lich         | dél.  | CES Toxicologie                                 |
| Mme  | PANOUSE Jacqueline      | tit.  | CES Microbiologie - Virologie - Immunologie     |
| Mme  | PAOLAGGI Françoise      | stag. | ED et TP, CES Electro-Chimie et 5ème A Biologie |
| M.   | PESTIS Jean             | tit.  | TP Anatomie, Physiologie Humaine                |
| Mme  | PIETTE Colette          | tit.  | CES Hématologie 5 A - Biologie                  |
| M.   | POULAIN Pierre          | tit.  | CES Hématologie 5 A - Biologie                  |
| M.   | POUSSET J. Louis        | tit.  | TP Chimie Extractive 5 A                        |
| M.   | QUENEZ Pierre           | tit.  | TP Chimie Générale et Minérale 1 A              |
| Mme  | RABIAN Odile            | dél.  | ED Chimie Analytique Qualitative                |
| M.   | RABARON Alain           | dél.  | CES Pharmacotechnie Chimique                    |
| Mme  | ROBERT Monique          | tit.  | CES Immunologie - Microbiologie                 |
| M.   | RODIER Noël             | dél.  | ED Physique 2 A                                 |
| Mlle | ROLLEN Alice            | tit.  | TP Botanique 1 A                                |
| Mlle | ROUSSET Renée           | tit.  | Essais médicaments végétaux                     |
| Mme  | RUDLER Michèle          | dél.  | ED Chimie Organique 1 - 2 A                     |
| Mme  | SALES Nicole            | stag. | TP Physiologie, Histologie                      |
| Mlle | SEBASTIEN Francine      | dél.  | TP Microbiologie 5 A (Biologie Officine)        |
| M.   | SCHUSTER Jean           | tit.  | Essais des médicaments chimiques et galéniques  |
| Mlle | SORIA Claudine          | stag. | ED et TP, 5è A Biologie Officine                |
| Mme  | SELLER Monique          | tit.  | TP Pharmacie Galénique Industrielle             |
| Mlle | STRUPLER Nicole         | tit.  | ED Chimie Générale et Minérale 1 A              |
| M.   | TOUBOUL J. Pierre       | dél.  | TP Chimie Analytique 5è A                       |
| M.   | TRIEU Thuong Cong       | tit.  | TP Chimie Analytique Quantitative               |
| Mlle | TROUPEL Solange         | stag. | TP Chimie Analytique Quantitative               |
| Mme  | VAN AMERONGEN Geneviève | dél.  | ED Chimie Analytique Quantitative               |
| M.   | VAYSSIERE J. Michel     | dél.  | ED Chimie Organique 1 - 2 A                     |
| Mme  | HUBERT J. (délég.)      |       | Microbiologie                                   |
| Mlle | BOURNIQUE C. (délég.)   |       | Botanique                                       |

## MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

|      |                |   |
|------|----------------|---|
| MM.  | GESTEAU P.     | + |
|      | GUERIN H.      | + |
| Mme  | HARISPE M.     | + |
| Mlle | LONGUEVALLE S. |   |
| M.   | HARISPE        | + |

## CHEFS DE TRAVAUX

|      |                       |       |                                                   |
|------|-----------------------|-------|---------------------------------------------------|
| MM.  | ANDRE Guy             | dél.  | TP Pharmacie Galénique 2 - 3 A                    |
|      | ADAM Yves             | tit.  | TP Pharmacie Chimique 5è A (Synthèse médicaments) |
| Mlle | AYMARD Pierre         | tit.  | ED Physiologie - Histologie                       |
| Mlle | BARNIER Suzanne       | dél.  | Mathématiques                                     |
| Mlle | BENOIS Martine        | dél.  | TP Botanique 2è A                                 |
| Mlle | BERNARD Jacqueline    | tit.  | TP Bactériologie 5è A - Industrie                 |
| M.   | BESANCON Pierre       | stag. | Mathématiques                                     |
| Mme  | BLANC Jeanine         | tit.  | ED Chimie Organique 1 - 2 A                       |
| Mme  | BONALY Jacqueline     | dél.  | ED Botanique 1 A                                  |
| Mme  | BOSCO A. Marie        | dél.  | TP Chimie Qualitative                             |
| M.   | BOURLIOUX Pierre      | dél.  | CES Bactériologie                                 |
| M.   | BOY Pierre            | dél.  | Mathématiques                                     |
| M.   | CAILLARD Claude       | dél.  | TP Pharmacodynamie A - 5 A.                       |
| M.   | CANAL Jacques         | dél.  | ED et TP 5è A Biologie Officine                   |
| M.   | CARRE Daniel          | dél.  | Mathématiques                                     |
| Mlle | CARRERE Clotilde      | tit.  | TP Microbiologie 4 A                              |
| M.   | CEOLIN René           | dél.  | ED Chimie Minérale 1 A                            |
| Mme  | CENAC Jacqueline      | tit.  | CES Parasitologie                                 |
| Mme  | CHARDENOT Paulette    | tit.  | Chimie Biologie 3 - 4 A                           |
| Mme  | CHARPENTIER Madeleine | tit.  | ED Chimie Générale et Minérale 1 A                |
| M.   | CHERON Jean-Marie     | dél.  | TP Chimie Biologique 3 - 4 A                      |
| Mlle | CLAIR Geneviève       | tit.  | ED Matière Médicale 3 - 5 A                       |
| M.   | DAGRON Christian      | tit.  | ED Chimie Générale et Minérale 2 A                |
| M.   | DAVY Jean             | dél.  | CES Biochimie                                     |
| Mlle | DECAUDIN M. Thérèse   | tit.  | TP Parasitologie 4 A                              |
| M.   | DELAITRE Jacques      | dél.  | ED et TP, CES Electro-Chimie et 5è A Biologie     |
| M.   | DELICOURT Alain       | dél.  | ED Botanique 2 A                                  |
| M.   | DOUSSIN Alexandre     | tit.  | TP Chimie Analytique 5 A                          |
| Mlle | DUCHENE Dominique     | dél.  | CES Pharmacie Galénique Industrielle              |
| Mlle | DUMANT Geneviève      | tit.  | CES Analyse physico-chimique des médicaments      |
| Mme  | DUPONT Charlotte      | tit.  | CES Pharmacodynamie                               |
| Mme  | ETIENNE Guy           | tit.  | TP Pharmacie Galénique 2 - 3 A                    |
| Mme  | FAURE Liliane         | stag. | ED Chimie Organique 1 - 2 A                       |
| Mlle | FLEURY Solange        | tit.  | ED Chimie Analytique Quantitative                 |
| Mlle | FOGLIETTI M. José     | tit.  | TP Chimie Biologique 3 - 4 A                      |
| M.   | GAIRARD Alexis        | dél.  | CES Contrôle médicaments (biologie)               |
| M.   | GAYRAL Philippe       | dél.  | TP Zoologie 1 A                                   |
| Mlle | GERMAN Françoise      | dél.  | Mathématiques                                     |
| M.   | GIRARDEAU J. François | dél.  | TP Chimie Organique 5 A (Synthèse Organique)      |
| M.   | GOBERT Jean           | stag. | TP Zoologie 1 A                                   |
| Mlle | GOUSAT M. José        | tit.  | ED Botanique 1 A                                  |
| M.   | CROSSIORD J. Louis    | dél.  | TP Physique 1 A                                   |
| Mlle | GUILLOUX Edith        | dél.  | TP Chimie Biologique 3 - 4 A                      |
| M.   | VILLERS Jacques       | tit.  | TP Physique 2 A                                   |
| Mme  | WELBY Josette         | dél.  | TP Pharmacie Galénique                            |

## BIBLIOTHEQUE

|      |               |   |                      |
|------|---------------|---|----------------------|
| Mlle | RUYSSEN Y.    | + | Conservateur en Chef |
| Mme  | DESCHIPPES A. |   | Conservateur         |
| Mme  | COULET M. A.  |   | Conservateur         |
| Mlle | LANGLOIS C.   |   | Conservateur         |
| N..  |               |   | Conservateur         |

Légion d'Honneur  
+ Chevalier  
0 Officier  
C Commandeur



A Monsieur le Doyen G. VALETTE

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris qui a porté une sollicitude attentive à notre travail et nous a fait l'honneur d'accepter la présidence du jury de cette thèse.

En témoignage de notre profonde gratitude et de notre respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur Y. COHEN

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris, qui nous a fait l'honneur de nous proposer ce sujet de thèse, de diriger nos travaux et qui nous a prodigué ses conseils avec une grande indulgence.

Qu'il trouve dans ces quelques mots le témoignage de toute notre gratitude et de notre profond respect.

A Monsieur le Professeur F. ROUSSELET

Maitre de Conférences-Agrégé à la Faculté de Pharmacie de Paris, qui n'a jamais cessé de nous encourager et de nous aider au cours de notre travail.

Qu'il soit assuré de notre fidèle reconnaissance et de notre sincère respect.

A Madame R. M. ROLLAND  
A Madame M. BESNARD  
A Madame L. BAUTERS  
A Madame NIOT  
A Madame THOMAS  
A Mademoiselle O. COSTEROUSSE

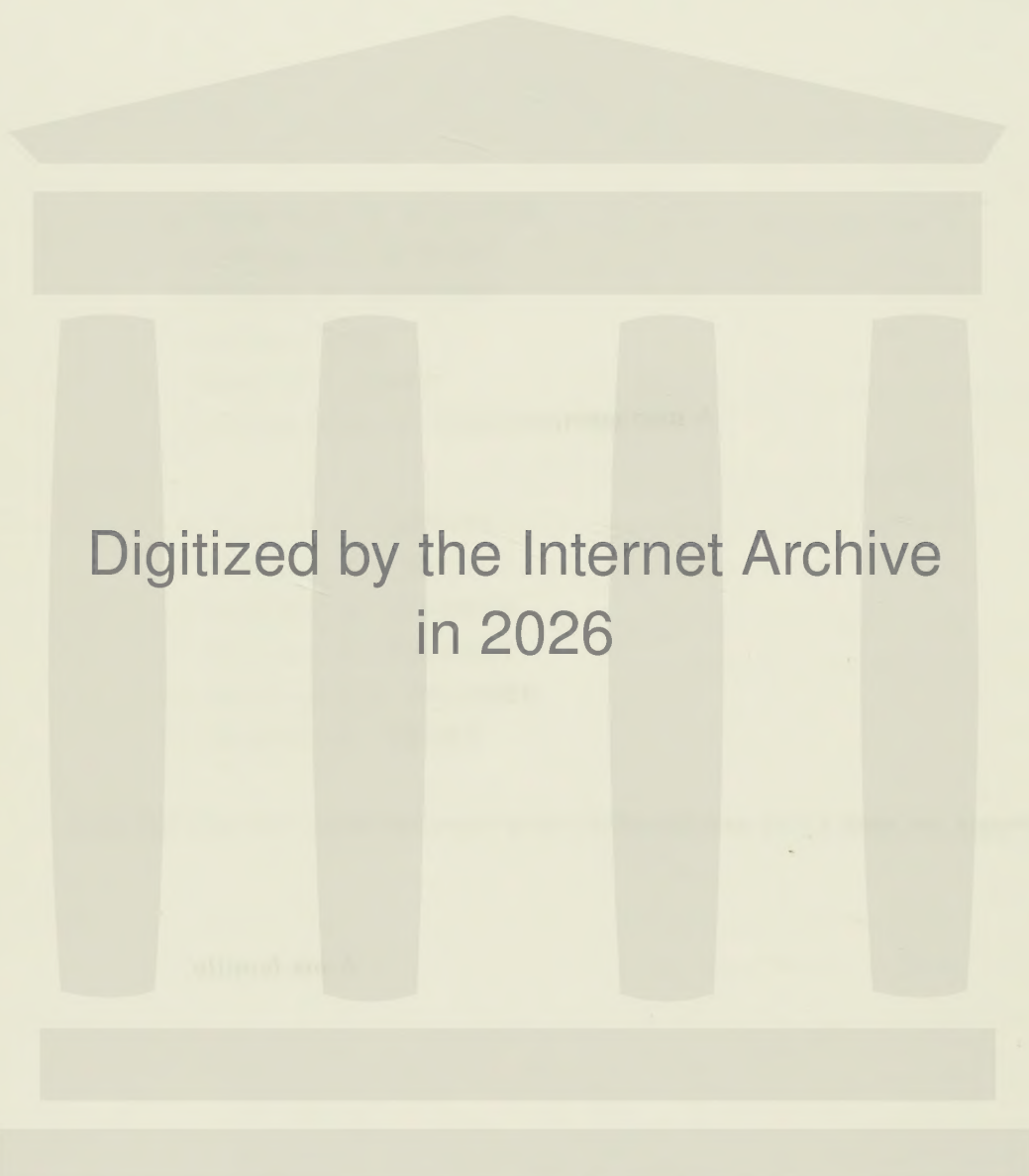
A Monsieur L. MERLIN  
A Monsieur Y. VIDEAU  
A Monsieur J. BRUNEAU  
A Monsieur P. FRAPART  
A Monsieur J. C. GALINIER  
A Monsieur A. VESIEZ

Avec nos très vifs remerciements pour l'aide efficace qu'ils nous ont apportée.

A ma mère,

A mon mari,

A ma famille.



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41551501\\_0011](https://archive.org/details/IA41551501_0011)

Ce travail a été effectué dans le Laboratoire de Contrôle Pharmaceutique du  
Département des Radioéléments du Commissariat à l'Energie Atomique, Centre d'Etudes  
Nucléaires de Saclay.



## CHAPITRE I

---

### INTRODUCTION



## ETUDE DU TRANSPORT DES COMPOSES MERCURIELS PAR LES PROTEINES SERIQUES

Les phénomènes de transport par les protéines plasmatiques ont retenu depuis longtemps l'attention des biologistes, mais aussi des pharmacologues. D'après GUILLOT (1967) pour chaque substance à transporter, il existe soit un transporteur spécifique soit des fractions plasmatiques qui peuvent jouer le rôle de transporteur secondaire ou accessoire de ces substances. Le mécanisme de liaison est connu seulement en partie ou reste encore complètement ignoré. L'étude de cette fixation permet non seulement de mieux comprendre les modalités d'action d'une substance médicamenteuse mais pour WELIN (1964) elle fournit aussi au pharmacologue un modèle précieux, un moyen d'approche en ce qui concerne la nature même de la liaison du médicament à ses récepteurs cellulaires. Les récentes applications des techniques modernes, tels que l'électrophorèse et la chromatographie ont conduit à l'acquisition de nombreuses données sur ce sujet et la démonstration du rôle principal que certaines fractions protéiques jouent dans ces phénomènes de transport. Ces techniques ont permis aussi d'établir le rôle restrictif de certaines protéines pour des substances spécifiques (DESGREZ, 1966).

Le transport des composés mercuriels par les protéines sériques a été peu étudié jusqu'à nos jours. C'est à HUGHES (1947) que nous devons d'avoir le premier mis en valeur, une liaison entre l'albumine et le chlorure mercurique. SAROFF (1953) avait remarqué le fait que la fixation de ce sel mercurique par l'albumine variait en fonction du pH et de leurs concentrations réciproques. DREVON (1955) et ses collaborateurs soumièrent à la migration électrophorétique avec du tampon véronal de pH = 8,6 et de force ionique égale à 0,1, les mélanges de sérum humain et de différents composés mercuriels tels que le chlorure mercurique, le salicylate de mercure et la Mercuresceine sodique (sel disodique de la dibromo-hydroxymercuri-fluorescéine). Ils constatèrent que cette dernière était fixée par l'albumine et les  $\alpha$  globulines. Par leurs études du chlorure mercurique et du salicylate de mercure, ils remarquèrent que leurs mobilités apparentes étaient moindres que celle des  $\alpha$  globulines et qu'en présence de sérum, ces deux dérivés mercuriels se situaient au niveau des albumines. Dans le cas du salicylate de mercure, l'ion salicylique et l'ion mercurique se trouvaient à la même place sur le support d'électrophorèse. Ce qui impliquait la fixation par l'albumine du médicament non altéré. TATI (1964) à l'aide du chlorure mercurique marqué au  $^{203}\text{Hg}$  s'intéressa au devenir du mercure dans le sang. Par la technique d'électrophorèse sur papier, il constate que ce composé mercuriel se situait surtout au niveau des  $\alpha$  globulines et en très faible quantité au niveau de l'albumine. CEMBER (1968) et ses collaborateurs étudièrent plus en détail *in vivo* la distribution du  $^{203}\text{Hg}$  dans les différentes fractions du sang, en particulier parmi les protéines. Les résultats de la distribution du mercure parmi les protéines sériques, obtenus par électrophorèse leur permirent d'observer que si le sérum était prélevé presque immédiatement après l'injection du composé mercuriel à

l'animal, la radioactivité se trouvait au niveau des  $\alpha$  globulines. Mais si le sérum était prélevé 48 heures après l'injection, la radioactivité se situait alors au niveau de l'albumine.

Nous nous sommes proposés dans ce travail de mettre en évidence in vitro une liaison entre les protéines sériques et différents composés mercuriels marqués avec les radioisotopes du mercure  $^{203}\text{Hg}$  ou  $^{197}\text{Hg}$  :

- deux sels mercurique, le chlorure mercurique et l'acétate mercurique,
- deux composés organo-mercuriels, le MHP et la Chlormérodine.

Dans ce but nous avons fait appel aux méthodes d'études propres à la radioactivité que nous avons combinées aux techniques de séparation des protéines. Nos recherches ont porté sur des sérums l'Homme et de Lapin.

Dans une première partie de notre travail, nous rappelons les notions physico-chimiques des radionucléides du mercure. Nous rappelons aussi quelques notions sur l'activité biologique des composés mercuriels, sur la structure des protéines et la liaison protéines-mercure.

Dans une seconde partie, de travaux personnels, nous exposons les méthodes générales d'études que nous avons choisies : dialyse, fractionnement électrophorétique, autoradiographie, mesure de la densité optique des électrophorégrammes et des documents autoradiographiques obtenus, chromatographie sur gel de dextrane avec détermination de la concentration protéique et de la radioactivité des fractions séparées, enfin immunoélectrophorèse.

Ces méthodes ont été appliquées à l'étude du transport de chaque composé mercuriel par les protéines, ainsi qu'à l'action d'un thioloprive, le N-éthyl-maléimide, sur la liaison protéine-dérivé mercuriel.

Dans une discussion générale nous rappelons l'ensemble de nos résultats et cherchons à expliquer les différents phénomènes que nous avons pu observer.

CHAPITRE II

LES ISOTOPES DU MERCURE ET  
LES ORGANO-MERCURIELS RADIOACTIFS

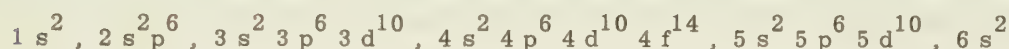


## LE MERCURE ET SES ISOTOPES

### 1 - Le Mercure

- Le mercure est situé dans la classification périodique de Mendéléeff dans le groupe II b.

Sa structure électronique est :



Il possède le cortège électronique du Xénon complété par 14 électrons au niveau 4 f sur la couche N, 10 électrons au niveau 5 d sur la couche O et 2 électrons au niveau 6 s sur la couche P. C'est l'organisation électronique à la périphérie qui lui confère ses propriétés chimiques, en particulier la couche de rang O pseudo saturée par 18 électrons, et la couche P de 2 électrons s.

- Le mercure forme des liaisons covalentes avec le soufre, l'azote et le carbone :

- l'extrême affinité du soufre et du mercure s'affirme dans la facilité avec laquelle ces deux corps se combinent dès la température ordinaire quand on les broie simplement ensemble. On obtient le composé Hg S ou cinabre qui est la forme sous laquelle le mercure se trouve dans la nature.
- le mercure forme très facilement des liens de covalence avec l'azote des amines, des amides et des imides.
- il s'associe très aisément au carbone, d'une façon exceptionnelle. On peut dire qu'il se substitue à l'hydrogène et particulièrement à l'hydrogène des noyaux aromatiques, ou des amines. Enfin il se fixe sur les doubles liaisons aussi facilement qu'un halogène.

## 2 - Les Isotopes

On connaît actuellement les isotopes du mercure ayant les nombres de masse respectifs :

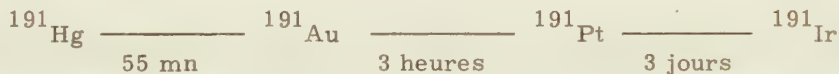
188, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205

Parmi ceux-ci sont stables les isotopes :

196, 198, 199, 200, 201, 202, 204

### - Radioactivité des isotopes

- L'isotope 189 aurait une période de  $23 \pm 2$  mn. Il se désintègre en  $^{189}\text{Au}$  par capture électronique.
- L'isotope 190 a une période de 90 mn. On connaît mal son processus de désintégration.
- L'isotope 191 a, suivant les auteurs, une période soit de 57 mn, soit de 55 mn. Il se désintègre par capture d'électron suivant la suite de réactions nucléaires :



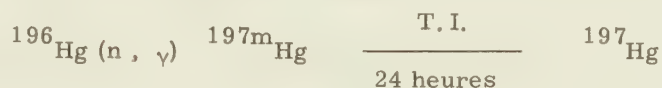
- L'isotope 192 a une période voisine de 6 heures. Il se désintègre en or par capture électronique et émission d'un rayonnement  $\beta^+$  d'énergie maximum de 1,18 MeV ainsi que des électrons de conversion de 0,18 MeV et un rayonnement  $\gamma$  de 1,39 MeV.
- L'isotope 193 présente une période de 6 heures et son isomère métastable une période de 11 heures. Il se désintègre en  $^{193}\text{Au}$ . L'évolution se fait selon deux processus. Un processus correspond à une capture électronique et affecte 84 % de ces évolutions. Le reste 16 % comporte une transition interne qui conduit au niveau fondamental du nucléide  $^{193}\text{Hg}$  qui par capture électronique donne  $^{193}\text{Au}$ . Il y aurait aussi émission de  $\beta^+$  faible.
- L'isotope 194 paraît stable car en bombardant Au avec des protons aucune radioactivité attribuable à ce nombre de masse n'a pu être observé. Cependant certains auteurs ont indiqué une période de 130 jours et une désintégration par capture électronique.
- L'isotope 195 a une période de 9,5 heures et se désintègre par capture électronique. On connaît aussi un isomère métastable de même nombre de masse ayant une période de 42 heures. Cet isomère se désintègre partie par capture électronique et partie par transition interne dans les proportions de 52 % et 48 % respectivement. Les désintégrations de ces isotopes 195 du mercure aboutissent finalement à l'isotope  $^{195}\text{Au}$ .

- L'isotope 197 sera étudié plus en détail ultérieurement, ainsi que l'isotope 203.
- L'isotope 205 a une période de 5,6 mn. Sa désintégration se fait par émission d'énergie maximum 1,62 MeV.

## 2.1 - L'isotope 197

### a) Préparation

Le radionucléide  $^{197}\text{Hg}$  est préparé par activation d'une cible de  $^{196}\text{HgO}$  stable à l'aide d'un flux de neutrons thermiques suivant la réaction de formation :



La cible d'oxyde mercurique  $\text{HgO}$  présente une section efficace de 4,5 barns à un flux de  $10^{12}$  neutrons/cm<sup>2</sup>/seconde. Le schéma de désintégration du  $^{197}\text{Hg}$  et de son isomère  $^{197m}\text{Hg}$  est donné par la figure 1.

L'activité spécifique d'un radioélément (A.S.) qui est le rapport du nombre d'atomes radioactifs au nombre d'atomes totaux, est généralement exprimée en mCi/mg d'élément métallique.

Elle se calcule après irradiation de la cible par la formule :

$$A = \varphi \cdot \Sigma \cdot N \cdot (1 - e^{-0,693 \frac{t}{T}})$$

dans laquelle :

- A est l'activité spécifique en Curie par g d'élément
- $\varphi$  représente le flux de neutrons/cm<sup>2</sup>/seconde
- $\Sigma$  est la section efficace en cm<sup>2</sup>
- N est le nombre de noyaux soumis à l'irradiation
- t est le temps d'irradiation de la cible
- T est la période du corps formé.

L'activité volumique d'un radioélément est le rapport du nombre d'atomes radioactifs au volume contenant ce nombre d'atomes. Elle s'exprime en mCi/ml de solution.

L'unité de radioactivité est le Curie (Ci) : Elle représente le nombre de noyaux d'un radioisotope qui se désintègre au rythme de  $3,7 \times 10^{10}$  désintégrations par seconde. Les sous-unités sont : le millicurie (mCi) qui vaut  $3,7 \times 10^7$  désintégrations par seconde, et le microcurie ( $\mu\text{Ci}$ ) qui est égal à  $3,7 \times 10^4$  désintégrations par seconde.

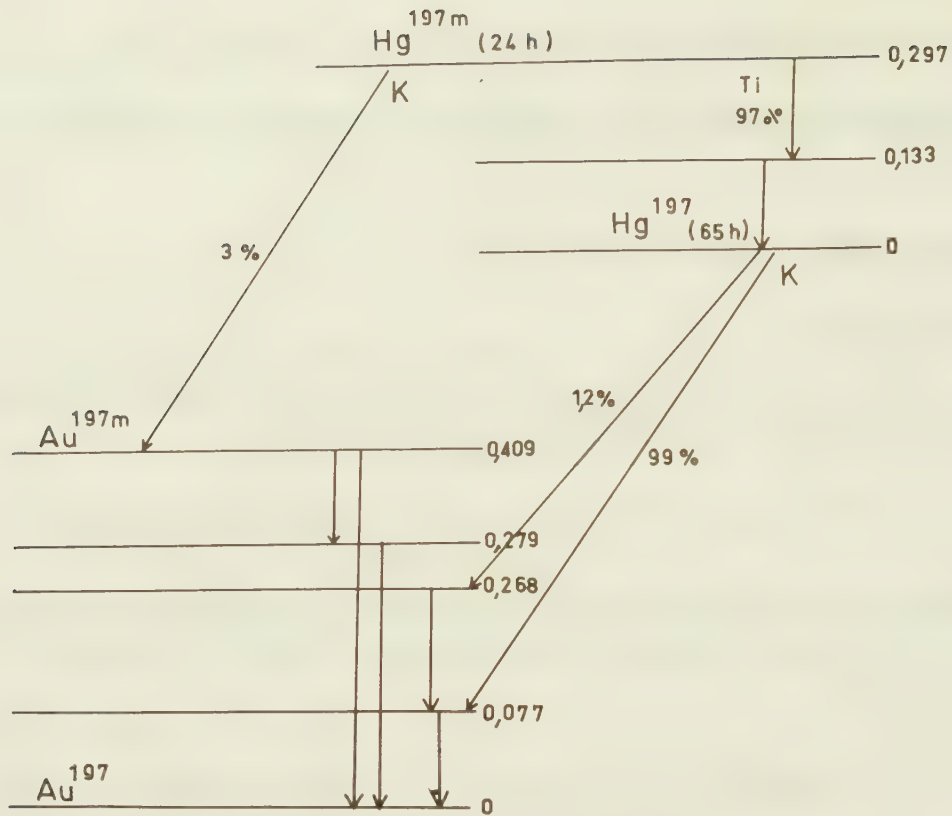


Figure 1 - Schéma de désintégration du  $^{197}\text{Hg}$  et de son isomère  $^{197m}\text{Hg}$ .

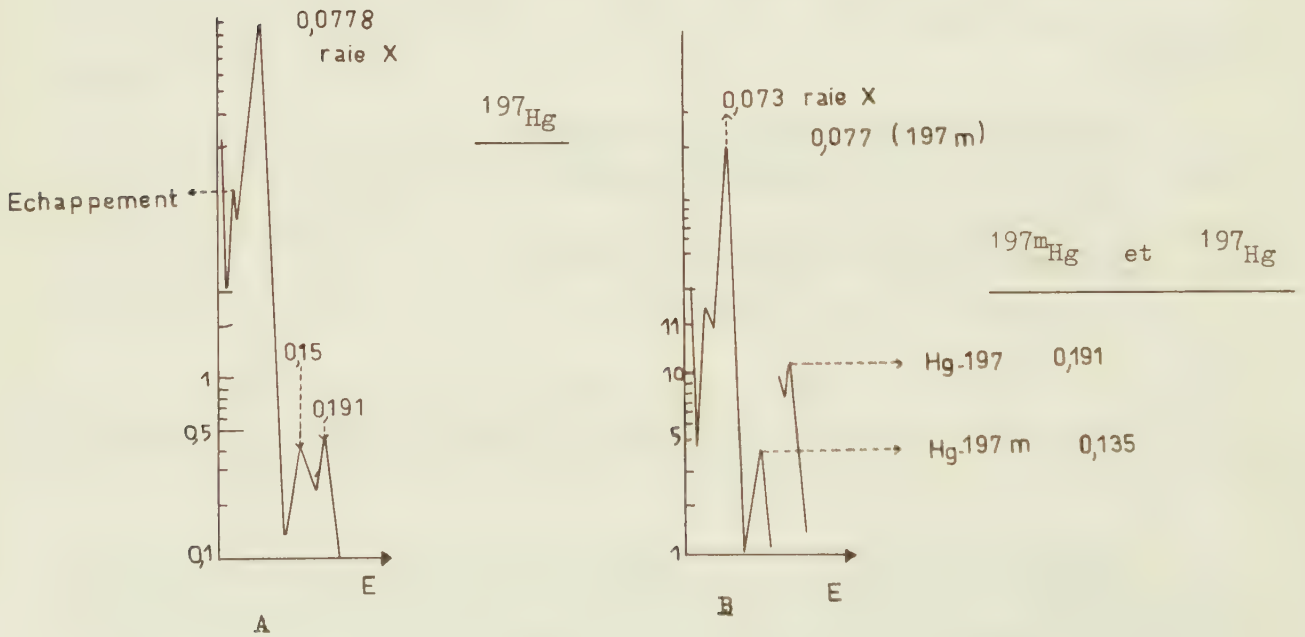


Figure 2 - Spectre d'émission : A/ du  $^{197}\text{Hg}$   
B/ du  $^{197}\text{Hg}$  et de son isomère  $^{197m}\text{Hg}$

Au cours de la préparation du  $^{197}\text{Hg}$  il se forme moins de 1 % de  $^{203}\text{Hg}$ .

L'activité spécifique par gramme d'élément due au flux de  $10^{12}$  neutrons/cm<sup>2</sup>/seconde est après une semaine d'irradiation de 350 mCi et après irradiation de la cible jusqu'à sa saturation de 360 mCi.

Le flux de neutrons disponibles allant de  $10^{11}$  à  $10^{13}$  neutrons/cm<sup>2</sup>/seconde, il faut en tenir compte dans le calcul de l'activité spécifique possible.

b) Caractères physiques du  $^{197}\text{Hg}$  et de son isomère  $^{197m}\text{Hg}$

Dans le tableau I nous avons réuni ces caractères physiques, et représenté les spectres d'émission de ces deux radionucléides par la figure 2.

TABLEAU I  
Caractères physiques de  $^{197}\text{Hg}$  et  $^{197m}\text{Hg}$

| Elément                                                                                              | Période   | Béta                                                      | Gamma                                                                                                   |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| $^{197m}\text{Hg}$                                                                                   | 23 heures | C. E. 3 %.                                                | T. I. 97 %.<br>0,133 } direct via $^{197}\text{Au}$<br>0,164 } (7,2 sec.)<br>et autres de 0,077 à 0,409 |
| $^{197}\text{Hg}$                                                                                    | 65 heures | C. E. 99 % au<br>niveau 0,077<br>1,2 % au<br>niveau 0,268 | 0,078<br>0,912                                                                                          |
| T. I. = transition isomérique<br>C. E. = capture électronique<br>Les énergies sont exprimées en MeV. |           |                                                           |                                                                                                         |

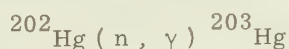
## 2.2 - L'isotope $^{203}\text{Hg}$

### a) Préparation

Le  $^{203}\text{Hg}$  est préparé par irradiation d'une cible de  $^{202}\text{Hg}$  stable sous la forme de  $\text{HgO}$ , à l'aide d'un flux de neutrons thermiques de  $10^{11}$  à  $10^{12}$  neutrons/cm<sup>2</sup>/seconde.

La cible a une section efficace de 1,13 barn.

La réaction de formation est la suivante :



La pureté radioactive en  $^{203}\text{Hg}$  est supérieure à 99 %.

L'activité spécifique par gramme d'élément au flux de  $10^{12}$  neutrons/cm<sup>2</sup>/seconde est après une semaine d'irradiation de 8,9 mCi, après quatre semaines de 29 mCi, et après irradiation de la cible jusqu'à saturation de 92 mCi. Comme pour le  $^{197}\text{Hg}$  dans le calcul de l'activité spécifique, il faudra tenir compte des variations de flux de neutrons.

b) Caractères physiques du  $^{203}\text{Hg}$

Nous avons rassemblé les caractères physiques du  $^{203}\text{Hg}$  dans le tableau II et représenté le spectre d'émission ainsi que le schéma de désintégration de ce radionucléide par les figures 3 et 4.

TABLEAU II  
Caractères physiques du  $^{203}\text{Hg}$

| Elément           | Période  | Béta              | Gamma              |
|-------------------|----------|-------------------|--------------------|
| $^{203}\text{Hg}$ | 46 jours | 100 %    0,21 MeV | 100 %    0,279 MeV |

La pureté de l'émission du  $^{203}\text{Hg}$  est telle que celui-ci est utilisé comme point d'étalonnage en spectrométrie.

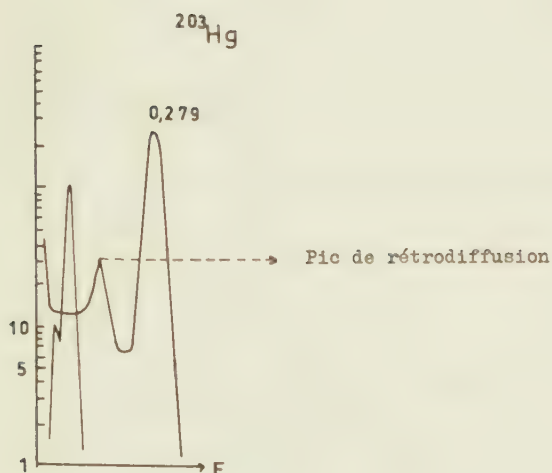


Figure 3 - Spectre d'émission du  $^{203}\text{Hg}$

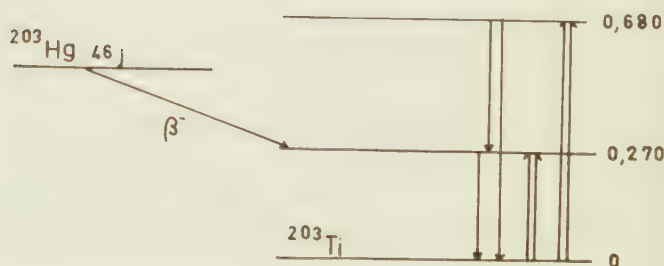


Figure 4 - Schéma de désintégration du  $^{203}\text{Hg}$

## STRUCTURE DES ORGANO-MERCURIELS

Le mercure possède à un très haut degré la faculté de former facilement des liens de covalence avec le carbone. Dans ses combinaisons organo-métalliques, le mercure possède toujours la valence 2 qui se prête seulement à la formation d'un ou deux liens de covalence entre le mercure et le carbone.

En appelant R un radical organique, X un groupe négatif monovalent ou un élément négatif monovalent, on peut envisager à côté de sels mercuriques  $\text{Hg X}_2$  proprement dits deux autres types de dérivés du mercure :  $\text{R - Hg - X}$  et  $\text{Hg - R}_2$  qu'on qualifie de monosubstitués et de disubstitués.

### 1 - Les organo-mercuriels

Suivant JANOT (1955), les composés organo-mercuriels peuvent être classés en trois catégories :

#### 1 - Les composés non complexes

C'est le groupe des sels organiques vrais de mercure, comme par exemple :

- l'acétate mercurique
- le benzoate de mercure

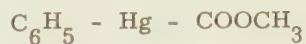
Ces composés sont très toxiques et non employés en médecine.

#### 2 - Les composés semi-complexes

Le mercure est lié par une valence à un atome de carbone d'un noyau aromatique ou d'une chaîne aliphatique et par l'autre valence à un élément inorganique ou bien à un radical acide appartenant à la série grasse.

Exemple :

- L'acétate de phényl-mercure



- L'acétyl mercury hydroxy propane



Il a été préparé un grand nombre de composés semi-complexes :

- Acétates organo-mercuriels renfermant des radicaux alkyles ou aromatiques : hydroxyde, chlorure, azotate, borate, acétate de phényl mercure.
- Des produits plus complexes du type  $\text{R} - \text{Hg} - \text{O} - \text{R}$  résultant de l'action d'hydroxyde d'alkyl mercure sur des composés phénoliques.

### 3 - Les composés complexes

Le mercure est lié à deux résidus de carbure et entièrement engagé en combinaison organique.

Exemple :

- Diphényl mercure



- Dicyclohexylmercure



Parmi ces derniers composés, il faut signaler des dérivés dans lesquels le mercure est lié directement par une valence à un atome de carbone et par l'autre valence, soit à un atome de soufre, soit à un atome d'azote.

Les substances du premier groupe sont assez toxiques et douées d'une très grande puissance antiseptique. Elles sont capables de détruire le bacille de KOCH en solution à 1/500 000ème.

## 2 - Structure des organo-mercuriels diurétiques

FRIEDMAN (1957) montra que les organo-mercuriels diurétiques couramment employés présentent une certaine similitude de base dans leur structure. Ce sont des composés mercuriels semi-complexes, à trois carbones dans lesquels les trois substituants sont désignés par X, OY, R, selon la formule :

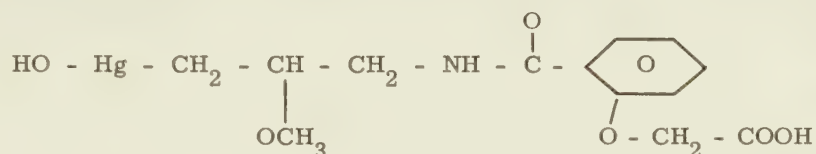


La nature du substituant X (habituellement un halogène, la théophylline ou un thio-glycolate) n'a aucune action sur le potentiel diurétique si le composé est donné par voie intra-veineuse, mais d'une part il agit sur le coeur et la respiration, d'autre part une dizaine de jours après son administration, sa toxicité rénale se révèle.

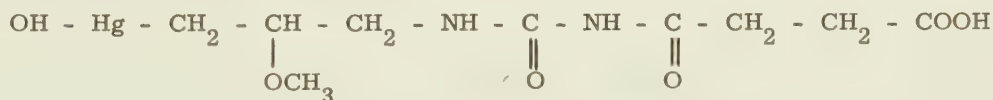
La nature du groupement OY est déterminée par le solvant dans lequel est préparé la mercuration. C'est un groupement hydroxyl si le solvant est de l'eau, un groupement méthoxy ou éthoxy suivant l'alcool utilisé comme solvant. Si le groupement OY est représenté par OH ou OCH<sub>3</sub> ou OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub> il ne possède aucune action, ni sur la toxicité du composé mercuriel dans l'organisme ni au niveau rénal.

Par contraste, la nature du groupement R qui est généralement très complexe a une très importante activité sur la toxicité et l'activité diurétique.

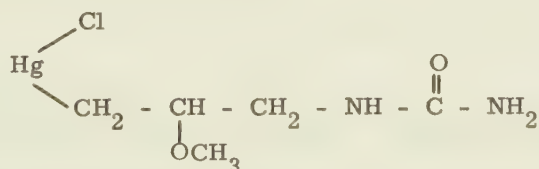
R est l'acide 0 - carbamyl-phénoxyacétique dans le MERSALYL ou hydroxy meri 3 - méthoxy 2 - propyl 1 - carbamyl - 0 - phénoxy - acétique



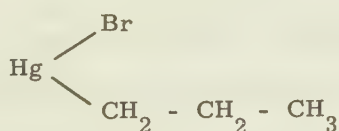
R est la succinylurée dans le 1(3' hydroxymercuri-2'-méthoxy-propyl)3 succinylurée qui, associée à la théophylline, est déposée sous le nom de MERALLURIDE



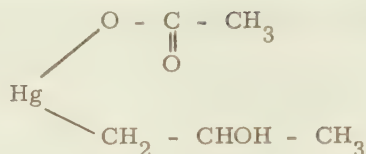
R est l'urée dans la CHLORMERODRINE ou chloromercuri 3- méthoxy 2-propylurée



KESSLER et ses collaborateurs (1957) ont montré que la structure déterminée par FRIEDMAN est valable pour un grand nombre de dérivés mercuriels diurétiques mais qu'il pouvait exister des composés mercuriels ayant cette structure de base et ne présentant aucune activité diurétique connue. Tels :



ou le acétyl mercuri 3- hydroxy 2- propane



D'autre part, certains composés mercuriels ne présentant aucune similitude de structure avec celle proposée par FRIEDMAN peuvent avoir une activité diurétique, tel le chlorure mercurique.

Depuis les travaux de FRIEDMAN, aucune règle n'a pu être établie sur la structure de base des organo-mercuriels diurétiques.

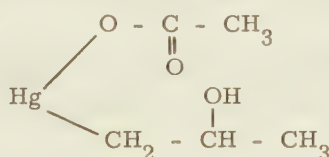
### 3 - Les organo-mercuriels étudiés : MHP et CHLORMERODRINE

Au cours de notre étude de la fixation des composés organo-mercuriels par les protéines sériques nous avons utilisé spécifiquement : le MHP et la CHLORMERODRINE.

#### 3.1 - Le MHP

##### a) Formule

Le MHP ou acétyl mercuri hydroxy propane

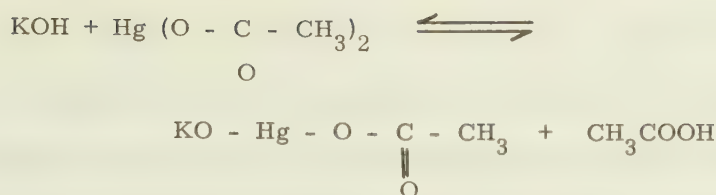


est le plus souvent appelé MHP. Il est marqué soit au  $^{197}\text{Hg}$  soit au  $^{203}\text{Hg}$ .

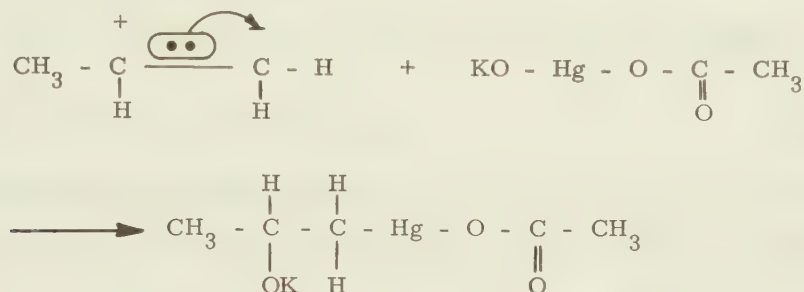
##### b) Synthèse

Ce produit est préparé par synthèse selon la méthode de WAGNER (1964) à partir des indications de SAND et HOFMANN (1900). Ces auteurs après avoir découvert la réaction de l'acétate mercurique sur les liaisons éthyléniques l'ont généralisée aux homologues supérieurs de la série éthylénique.

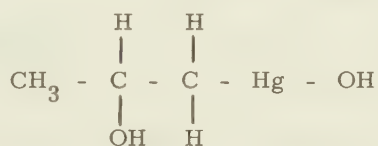
L'acétate mercurique  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$  en milieu alcoolique ou aqueux, sous un pH assez élevé agit sur un dérivé organique contenant de l'hydrogène lié au carbone en des points stériquement accessibles. Dans la synthèse du MHP, WAGNER fait agir de l'acétate mercurique marqué au  $^{203}\text{Hg}$  ou au  $^{197}\text{Hg}$  sur du propylène en milieu potassique. La potasse prend part à la réaction et tout se passe comme s'il provoquait une hydrolyse du sel de mercure (PASCAL 1962)



Le sel mercurique ayant perdu la moitié de ses anions se fixe alors sur la liaison éthylénique du propylène suivant la polarité de celle-ci



Le corps formé est très soluble en milieu alcalin où il se trouve à l'état d'hydroxyde :



dans ce milieu il se conduit comme le sel peu ionisable d'un cation  $(\text{R} - \text{Hg})^+$ .

### c) Caractères physico-chimiques

Le MHP se présente sous la forme d'une solution aqueuse de pH = 9,6, isotonique et stérile. Sa stabilité à ce pH est très faible. En l'espace de quelques heures, les solutions passent de pH = 9,6 à pH = 9 puis lentement à pH = 8,5 où elles semblent se stabiliser. Il peut arriver que le jour même de la fabrication le pH du MHP soit à pH = 8. Il suffit pour l'ajuster à son pH de 9,6 d'ajouter une goutte de solution de potasse normale.

Les caractères des préparations utilisées sont les suivants :

#### - Pour le MHP marqué au $^{197}\text{Hg}$

- . La concentration radioactive ou activité volumique est mesurée à 5 % près : 0,3 mCi/ml
- . La pureté radioactive en  $^{197}\text{Hg}$  est supérieure à 99 % après mesure par spectrométrie.
- . La pureté radiochimique en mercure organique est supérieure à 98 %.
- . L'activité spécifique est de l'ordre de 80 à 100  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ .

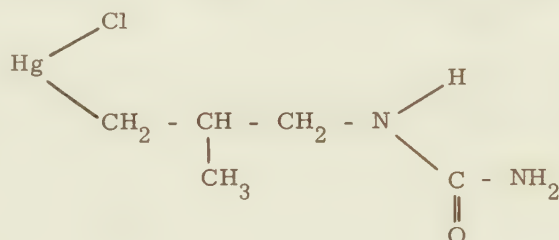
- Pour le MHP marqué au  $^{203}\text{Hg}$  -

- . La concentration radioactive mesurée à 5 °/° près est de 0,1 à 0,2 mCi/ml.
- . La pureté radioactive en  $^{203}\text{Hg}$  est supérieure à 99 °/°, après mesure par spectrométrie.
- . La pureté radiochimique en mercure organique est supérieure à 98 °/°.
- . L'activité spécifique est de l'ordre de 15 à 20  $\mu\text{Ci}$  par mg.

### 3.2 - La chlormérodriine

#### a) Formule

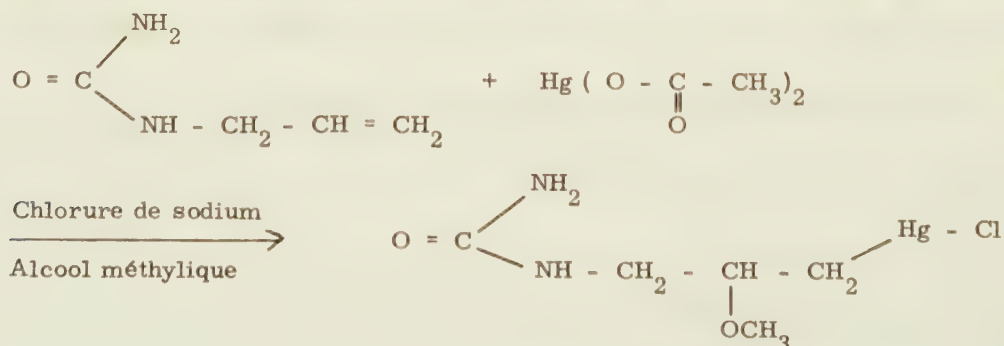
La Chlormérodriine déposée sous le nom de NEOHYDRINE, est le chloromercuri 3-méthoxy 2- propylurée



est marquée soit au  $^{197}\text{Hg}$  soit au  $^{203}\text{Hg}$ .

#### b) Synthèse

BORGHRAEF et PITTS (1956) synthétisèrent pour la première fois la Chlormérodriine marquée en faisant une réaction de méthoxy mercuration sur l'allylurée, ROSA et ses collaborateurs (1963) mirent la technique industrielle au point. C'est à TANAKA (1968) que l'on doit la synthèse rapide de la Chlormérodriine marquée au  $^{203}\text{Hg}$ . L'acétate mercurique est additionné à l'allylurée en présence d'alcool méthylique et de chlorure de sodium, selon la réaction :



Le résidu acide obtenu après la méthoxymercuration est remplacé par l'ion chlore en faisant agir le composé d'addition avec le chlorure de sodium.

Pour obtenir de la Chlormérodrene de haute activité spécifique il faut réaliser cette synthèse avec des volumes très petits, ce qui demande une série de précautions. En particulier pour éviter la formation de composés de condensation, l'allylurée doit être ajoutée très lentement à la solution d'acétate mercurique dans le méthanol. Cette solution doit être maintenue en agitation continue et à température constante.

c) Caractères physico-chimiques

Les caractères des préparations utilisées sont les suivantes :

- Pour la Chlormérodrene marquée au  $^{197}\text{Hg}$

- . La concentration radioactive est mesurée à 5 % près de 0,1 à 0,5 mCi/ml.
- . La pureté radioactive en  $^{197}\text{Hg}$  est supérieure à 99 % après mesure par spectrométrie.
- . La pureté radiochimique en mercure organique est supérieure à 99 %.
- . L'activité spécifique est de l'ordre de 200 à 500  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ .

- Pour la Chlormérodrene marquée au  $^{203}\text{Hg}$

- . La concentration radioactive, est mesurée à 5 % près, de 0,1 à 0,3 mCi/ml.
- . La pureté radioactive en  $^{203}\text{Hg}$  est supérieure à 99 %.
- . La pureté radiochimique en mercure organique est supérieure à 99 %.
- . L'activité spécifique est de l'ordre de 50 à 200  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ .



CHAPITRE III

---

PROPRIETES BIOLOGIQUES DES ORGANO-MERCURIELS



## PROPRIETES BIOLOGIQUES DES COMPOSES MERCURIELS

Les composés mercuriels de par leurs actions biologiques sont utilisés depuis longtemps d'abord comme antiseptiques puis comme diurétiques. Avec l'apparition des radioéléments, nous avons vu naître l'utilisation des radionucléides du mercure en médecine nucléaire. Dans le domaine de la recherche biologique, les composés mercuriels ont été très utilisés pour détecter les groupements thiols des protéines.

La volatilité et la trop grande toxicité de l'ion mercurique qui est un poison cellulaire général à l'action d'ailleurs complexe ont fait préférer l'utilisation des composés organo-mercuriels. Dans ces composés le mercure est dissimulé mais facilement libérable. Sa toxicité est nettement diminuée par la liaison du mercure à une molécule organique.

Dans ce chapitre, nous étudierons l'action diurétique des composés organo-mercuriels, leur emploi en médecine nucléaire ainsi que leur utilisation en recherche biologique. Nous n'aborderons pas leur action antiseptique, celle-ci ne faisant pas partie de nos travaux.

### 1 - Diurétiques

#### 1.1 - Introduction

On connaît depuis longtemps les propriétés diurétiques de composés minéraux comme le calomel et le cyanure de mercure, mais ces composés trop toxiques ont été remplacés en clinique par des composés organiques.

En utilisant des doses équiactives et en tenant compte de la quantité de mercure administrée, on trouve plus de mercure dans les urines émises sous l'influence des dérivés organiques du mercure que dans le cas de ses sels minéraux. Cette constatation amène deux corollaires (BACQ 1961) :

- 1 - contrairement à l'opinion admise, les dérivés organiques sont moins efficaces que les sels minéraux ionisables,
- 2 - les dérivés organiques n'interviennent qu'en libérant le mercure ionisé.

Cependant les organo-mercuriels provoquent une diurèse plus abondante et plus prolongée que les composés minéraux quand ils sont administrés par voie intraveineuse ou intramusculaire. Ils s'ionisent lentement et ne précipitent pas les protéines tissulaires. Il faut noter en outre que le mercure ionisé seul est capable de traverser les parois glomérulaires.

### 1.2 - Mécanisme d'action

PITTS (1950) montra que la combinaison des sels mercuriels organiques ou non organiques avec les groupements SH de certains enzymes rénaux ayant un rôle dans la réabsorption tubulaire des ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  bloquait l'action physiologique de ces enzymes et entraînait un effet diurétique.

Depuis, de nombreuses théories sur le mode d'action des composés organo-mercuriels au niveau rénal ont été élaborées mais aucune jusqu'à présent n'a permis de connaître exactement le mécanisme d'action sur la diurèse.

Deux phénomènes semblent se produire pour provoquer la diurèse :

- la fixation au niveau rénal,
- l'excrétion rénale.

#### a) Etude de la fixation au niveau rénal

En utilisant la chlormérodine marquée au  $^{203}\text{Hg}$ , BORGHGRAEF (1956) montra que les organo-mercuriels se fixaient à forte concentration au niveau du cortex rénal, à concentration plus faible dans la partie extérieure de la région médullaire et très faiblement dans la partie papillaire de cette même région.

Il est intéressant de constater que les cellules en brosse qui bordent le segment du tube proximal situé dans le cortex rénal sont riches en protéines à groupements thiols (CAFAUNY, 1956).

#### . Etude de la fixation au niveau du cortex rénal

Pour WEINER (1962) le Hg des composés diurétiques est probablement lié autant à des protéines non spécifiques qu'à des récepteurs spécifiques. Cette liaison se ferait entre le

mercure et deux groupes sulfhydriles de façon analogue à une chélation. Connaissant la haute affinité des groupements SH pour le mercure, WEINER imagine des récepteurs ayant deux sites actifs Z ou W. Le site actif Z représenterait un groupement thiol, la nature du site W serait inconnue (figure 5).

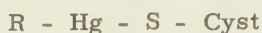
Pour que le composé organo-mercuriel soit diurétique, il faut qu'il se décompose complètement, libérant les deux valences du mercure pour bloquer les deux sites récepteurs. WEINER (1962) montra que cette décomposition ne se produisait que pour certains organo-mercuriels labiles en milieu hydrogène. La différence entre diurétiques et non diurétiques dans la catégorie des composés labiles en milieu acide, semble être attribuée à leur pouvoir d'être excrété dans l'urine. Ce pouvoir est probablement dû à une différence de distribution intrarénale. La corrélation entre labilité en milieu acide et action diurétique semble être attribuable à la divalence du cation mercurique qui se combine aux récepteurs appropriés.

#### b) Excrétion rénale de divers composés mercuriels

WEINER et MULLER (1955) démontrèrent par des méthodes polarographiques que la plus grande partie d'un organo-mercuriel excrété l'était sous la forme de complexe cystéique  $R - Hg - S - Cyst$  du composé organo-mercuriel intact ( $R - Hg^+$ ).

L'étude du produit de sécrétion du chlorure mercurique par voie intraveineuse révèle les mêmes caractères polarographiques du complexe mercuro-cystéine ( $Cyst - S - Hg - S - Cyst$ ). Ces deux modes d'excrétion permettent de considérer deux sortes de composés mercuriels :

- les composés organo-mercuriels excrétés sans rupture de la liaison  $C - Hg$  et qui apparaissent dans l'urine sous la forme du complexe mono-cystéine :



- les composés organo-mercuriels libérant les deux valences du mercure après rupture de la liaison  $Hg - C$  et qui apparaissent comme liés à deux cystéines



Ce mode d'excrétion n'est valable que pour les composés organo-mercuriels diurétiques. En effet, les composés non diurétiques bien que fixés au niveau du cortex rénal n'apparaissent qu'à l'état de trace dans l'urine.

WEINER (1962) proposa un schéma (figure 5) pour expliquer la relation entre la structure et l'activité pharmacologique des composés mercuriels. Il établit ce schéma en postulant que le degré de diurèse est proportionnel à la quantité de diurétique actif fixé sur les sites

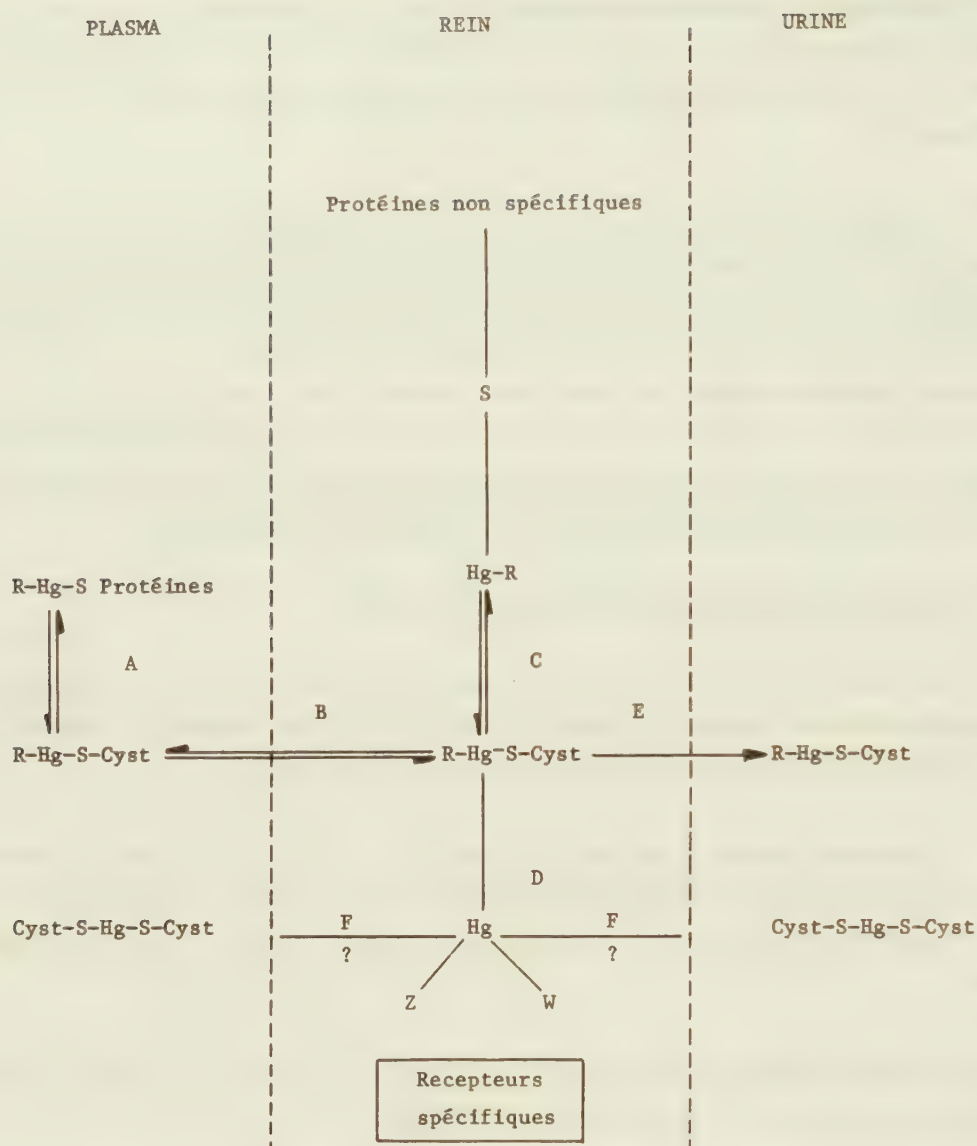


Figure 5 - Relation entre la structure et l'activité pharmacologique des composés mercuriels d'après WEINER (1962).

- A = Equilibre plasmatique du composé mercuriel
- B = Fixation du composé mercuriel par le rein
- C = Equilibre rénal du composé mercuriel
- D = Formation de l'ion mercurique
- E = Excrétion urinaire du composé mercuriel
- F = Excrétion urinaire et plasmatique de l'ion mercurique

récepteurs du tubul rénal et que des complexes solubles formés entre le composé mercuriel et d'autres composés porteurs de groupements SH que la cystéine peuvent exister dans le plasma ou dans le parenchyme rénal.

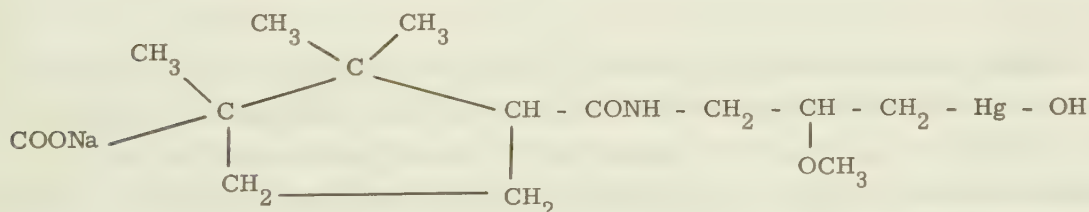
Dans ce schéma, en supposant que tout le composé mercuriel du plasma est lié aux protéines et aux acides aminés libres porteurs de groupements SH , A représente l'équilibre plasmatique de ces deux types de transport du composé mercuriel. B , figure l'échange du composé mercuriel entre le plasma et le rein. L'association de B + E exprime la sécrétion tubulaire rénale du composé mercuriel. C , est l'équilibre entre un complexe diffusible formé par un composé mercuriel lié à un groupement SH d'une protéine rénale spécifique et un complexe non diffusible formé par ce composé mercuriel lié à un groupement SH d'une protéine non spécifique. Cette liaison non spécifique est mise en évidence par la fixation des organo-mercuriels non diurétiques au niveau du rein, et par le fait que la concentration rénale de tout le mercure n'est pas en corrélation avec le degré de diurèse quand différents organo-mercuriels diurétiques sont administrés. D , exprime la décomposition du composé mercuriel en ion mercurique. Cette décomposition se fait dans le rein mais on ignore à quel niveau exactement. WEINER suppose qu'elle se produit très près des récepteurs spécifiques. Pour cet auteur, F , expliquerait qu'aucune accumulation des ions mercuriques dans les reins ne soit observée. Le mercure ionique doit être éventuellement libéré des sites récepteurs spécifiques et être transformé en complexe dicystéique, Cyst - S - Hg - S - Cyst , diffusible vers le plasma et l'urine.

#### c) Utilisation actuelle des composés mercuriels diurétiques

Les dérivés organo-mercuriels utilisés encore de nos jours en médecine sont :

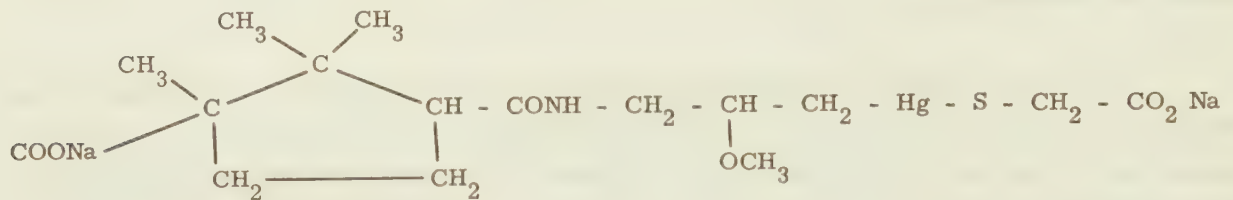
- la MERCUROPHYLLINE ou NOVURIT qui est formé de l'association en proportions sensiblement équimoléculaire de la MERCURINE et de la théophylline.

La MERCURINE est :



La MERCUROPHYLLINE est utilisée comme diurétique dans le cas d'oedèmes d'origine cardiaque ou rénal et dans les néphrites.

- 1a MERCAPTOMERINE ou THIOMERINE qui est le sel disodique de l'acide N (  $\gamma$  - carboxy - méthyl - mercaptomercuri -  $\beta$  méthoxy) propyl camphorique.



C'est un diurétique ayant des effets satisfaisants sur l'élimination du chlorure de sodium chez les malades atteints d'oedèmes dus à des troubles cardiaques, hépatiques et rénaux. La présence du groupe thiol diminue l'action cardiaque.

Pour EARLEY (1967) ces agents diurétiques présentent le désavantage de demander une administration parentérale répétée et en dépit de tentatives passées aucune utilisation clinique par voie orale n'a été adoptée. L'effet tubulaire des organo-mercuriels n'apparaît pas aussi clairement démontrable qu'avec d'autres diurétiques de structure chimique différente. L'évidence indique que leur action interfère avec la réabsorption du sodium au niveau du tube proximal et que leurs sites d'action sont différents de ceux des autres agents diurétiques. Le mécanisme d'action des organo-mercuriels sur la réabsorption du sodium n'est pas connu, mais on pense que cette réabsorption doit être liée à la libération intracellulaire de l'ion mercurique. Parmi les agents diurétiques, les organo-mercuriels sont les seuls auxquels une néphrotoxicité a été directement attribuée. Ils agissent presque autant sur l'excrétion du sodium que sur celle du chlore et provoquent ainsi une alcalose hypochlorémique. L'efficacité diurétique des organo-mercuriels n'existe plus en présence d'alcalose hypochlorémique et par conséquent l'efficacité de ces agents est relevée par l'administration intermittente d'agents acidifiants tels que le chlorure d'ammonium ou l'acétazolamide. Ils ont une action cliniquement très importante sur l'inhibition de la sécrétion du potassium et bien qu'ils doivent interférer sur la réabsorption proximale du sodium par le mécanisme d'échange sodium-potassium, ils ne provoquent pas une disparition du potassium aussi rapide que les autres agents diurétiques.

Comme l'ont montré des expériences de diurèse unilatérale après injection dans une artère rénale, il est bien établi que les organo-mercuriels diurétiques agissent directement sur le rein. On peut penser que la sécrétion tubulaire active des organo-mercuriels conduit à leur accumulation dans une région où sont localisés des enzymes jouant un rôle dans la réabsorption de sels et d'eau. Du blocage de ces enzymes résulterait l'effet diurétique. Si la diurèse est attribuable à la libération de l'ion mercurique, ce processus doit se produire dans le rein. Les déterminants biologiques de la rupture de la liaison seraient : le pH du milieu environnant, la nature et la concentration des SH. L'inhibition des groupements thiols n'est peut être pas le seul facteur entraînant une diurèse.

## 2 - Emploi des composés mercuriels marqués en médecine nucléaire

### 2.1 - Les organo-mercuriels marqués au mercure radioactif

Depuis 1949, le mercure radioactif a été utilisé comme traceur pour les diurétiques mercuriels. Le traceur est un radioisotope, dans notre cas le  $^{203}\text{Hg}$  ou le  $^{197}\text{Hg}$ , utilisé à l'état élémentaire ou inclus dans une molécule complexe, qui mélangé à l'état de traces à des espèces chimiques identiques, mais normalement inactives, est susceptible grâce à sa radioactivité de les rendre plus aisément décelables.

THREEFOOT (1949) et ses collaborateurs étudièrent la disparition plasmatique, après injection intraveineuse chez l'homme, de la MERCURHYDRINE marquée au radionucléide  $^{203}\text{Hg}$ . Ils constatèrent que ce composé mercuriel diurétique quittait le plasma suivant une courbe décomposable en trois exponentielles.

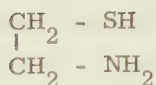
L'exponentielle la plus rapide serait le mélange du composé mercuriel dans le compartiment plasmatique. Dans ce compartiment, plus de 95 % du dérivé mercuriel est fixé aux groupements thiols des protéines du plasma et des protéines de la membrane externe des hématies.

L'exponentielle intermédiaire figurerait l'absorption rapide du produit au niveau de certains tissus : par des phénomènes de diffusion et des phénomènes chimiques. Le foie et la rate retiennent le composé mercuriel en quantité plus faible que les reins mais encore appréciable. Les muscles du squelette en retiennent une fraction minime.

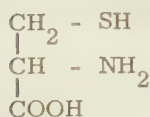
La partie la plus lente représenterait principalement l'excrétion rénale, avec une forte fixation au niveau du cortex rénal.

BORGHGRAEF et ses collaborateurs (1956) obtinrent les mêmes résultats en étudiant l'action de la Chlormérodine marquée au  $^{203}\text{Hg}$  chez le chien. Ils observèrent de plus que l'animal présentait une forte concentration rénale du produit radiopharmaceutique environ 1 ou 2 heures après administration intraveineuse, et que ce composé mercuriel se concentrait de façon sélective sur le cortex rénal, environ 10 fois plus que dans les régions papillaires et médullaires. Plusieurs études faites par KESSLER et ses collaborateurs (1957) révélèrent que sur treize organo-mercuriels diurétiques marqués au  $^{203}\text{Hg}$ , la Chlormérodine avait la plus forte concentration au niveau du cortex rénal. BORGHGRAEF et PITTS (1956) confirmèrent l'affinité de ce dérivé mercuriel pour les groupements thiols à l'aide du dithiopropanol ou BAL. Si on administre le BAL peu après ce diurétique, on observe une rapide décharge du dérivé mercuriel à la fois dans l'urine et dans le sang veineux rénal. CARDINAL (1969) confirma cette affinité pour les groupements SH en montrant que :

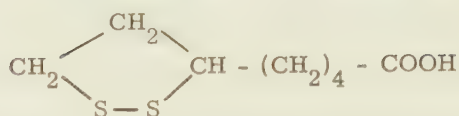
- le  $\beta$  mercaptoéthylamine



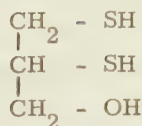
- la cystéine



- l'acide thioctique



avaient la même action que le BAL



sur la décharge rapide de l'organo-mercuriel dans l'urine.

## 2.2 - Les composés organo-mercuriels marqués utilisés en médecine nucléaire

Deux composés organo-mercuriels marqués avec du mercure radioactif ont trouvé une application importante en médecine nucléaire :

- la Chlormérodine
- le MHP

### 1) La Chlormérodine

La première utilisation de la Chlormérodine marquée en médecine nucléaire est due à BLAU (1959) pour la détection des tumeurs cérébrales. Ce composé a une large utilisation pour la détection et la localisation des tumeurs cérébrales par scintigraphie. Son efficacité pour ce sujet s'explique probablement par sa grande affinité pour les tissus et son élimination rapide du flot sanguin, comprenant le compartiment du sang vasculaire intracérébral.

Pour les scintigraphies cérébrales, le  $^{203}\text{Hg}$  présente l'intérêt d'avoir une seule émission  $\gamma$  et une émission  $\beta$  de faible énergie permettant ainsi une diminution de la dose d'irradiation du patient. Mais ces avantages sont diminués par la période physique du  $^{203}\text{Hg}$  de 47 jours. On pallie cet inconvénient en incorporant le  $^{203}\text{Hg}$  dans un composé de période biologique courte. Cette période doit être suffisamment courte pour permettre la clearance de la totalité du produit injecté, mais elle ne doit pas être si courte que la totalité de la radioactivité soit complètement éliminée de l'organisme avant que le scintigramme ne soit terminé. Le composé doit être non toxique, facilement synthétisable avec une haute activité spécifique et il faut que le mercure soit solidement lié. Après plusieurs essais de composés mercuriels divers, il fut conclu que les propriétés biologiques souhaitables ne pouvaient être atteintes qu'avec des composés organo-mercuriels présentant une liaison covalente avec le mercure. Par leur clea-

rance rapide dans l'organisme et leur faible toxicité les diurétiques mercuriels convenaient parfaitement. La chlormérodine fut choisie car elle se synthétisait très facilement. La clearance de ce composé marqué fut mesurée chez plusieurs patients. Moins de 10 % du produit restait dans l'organisme 5 heures après l'injection par voie intraveineuse. Par contre l'excrétion rénale se révélait très rapide. Presque la moitié de la Chlormérodine est excrétée durant les 8 premières heures, environ 10 % de la dose totale injectée se fixe dans les reins avec une demie-vie de 28 jours. Pour réduire l'augmentation et la rétention du produit par les reins on administre de la Mercurhydrine un jour avant la scintigraphie afin de bloquer les sites de fixation du mercure au niveau des reins. Ce procédé réduit de trois fois la rétention de la Chlormérodine. La Mercurhydrine a été choisie comme agent pour bloquer les récepteurs du mercure car c'est un produit facilement utilisable sous une forme injectable. Actuellement on tend à remplacer le  $^{203}\text{Hg}$  par le  $^{197}\text{Hg}$  qui présente l'intérêt d'avoir une période physique de 65 heures.

Après les expériences de KESSLER (1957) montrant que la Chlormérodine présentait la plus forte concentration au niveau du cortex rénal, Mc AFEE et WAGNER (1960) l'utilisèrent pour des scintigraphies rénales.

La scintigraphie rénale après administration intraveineuse de Chlormérodine  $^{203}\text{Hg}$  fournit une information sur la morphologie et la capacité fonctionnelle des reins. (DESGREZ, 1962). La différence entre la scintigraphie radioisotopique et le contraste radiographique est important car la technique du scintigraphe n'exige pas une forte concentration urinaire du produit si nécessaire pour obtenir l'opacité aux rayons X.

Cependant il faut une concentration suffisante de Chlormérodine pour avoir un bon scintigramme.

Les scintigraphies de patients présentant une franche urémie confirment que l'accumulation hépatique des organo-mercuriels diurétiques augmente alors que l'accumulation rénale diminue. On évite cet inconvénient en utilisant le complexe Chlormérodine  $^{203}\text{Hg}$ , cystéine. En effet la cystéine inhibe la liaison des organo-mercuriels au niveau du foie plus qu'au niveau rénal. En inhibant la liaison de la Chlormérodine pour les tissus autres que rénaux, la concentration rénale est augmentée et le scintigramme est amélioré.

Une dose de 100 à 150  $\mu\text{Ci}$  de Chlormérodine administrée par voie intraveineuse provoque une forte irradiation des reins par suite de la période physique du  $^{203}\text{Hg}$  et de la période biologique du composé mercuriel au niveau rénal. En se basant sur l'étude de patients normaux pendant 20 semaines les reins reçoivent 24 rads. La dose reçue par le sang, d'autres organes et la totalité de l'organisme est seulement de 0,13 rads. La demie-vie effective de la Chlormérodine est de 28 jours au niveau des reins, 50 % du radio mercuriel injecté est retrouvé dans l'urine 8 heures après l'injection et 66 % 24 heures après. Ainsi il ne reste que 9 % de la dose totale de radioactivité dans chaque rein après les 48 premières heures.

Afin de diminuer la dose rénale d'irradiation, plusieurs auteurs ont recommandé l'utilisation du Salyrgan marqué au  $^{203}\text{Hg}$ . La concentration rénale de ce composé mercuriel commence à diminuer très rapidement un quart d'heure après injection à cause de son excrétion urinaire plus rapide. Malheureusement sa concentration maximale rénale est considérablement plus faible que celle obtenue avec la Chlormérodine. On a préféré garder celle-ci en la marquant au  $^{197}\text{Hg}$  (Mc AFEE, 1969).

Une dose de 150  $\mu\text{Ci}$  de Chlormérodine  $^{197}\text{Hg}$  fournit une irradiation rénale de 1,5 rad, la dose reçue par tout l'organisme n'est que de 0,012 rad.

## 2) Le MHP

En 1957, les pharmacologistes KESSLER, LOZANO et PITTS dans une série d'études sur la relation entre la structure des organo-mercuriels et leur activité biologique avaient remarqué que ce composé n'avait aucune action diurétique. WEINER (1962) au cours de ses travaux sur les mercuriels non diurétiques montra que si ce composé était mis en présence de sang hépariné pendant quelques minutes, on retrouvait 98 % de la radioactivité très étroitement liée aux groupements SH des hématies. A la différence d'autres organo-mercuriels, le MHP était le seul dont la quantité fixée aux globules rouges n'était pas réduite après plusieurs lavages du mélange, sang-MHP, dans 10 volumes de sérum physiologique. WAGNER (1964) développa l'emploi du MHP marqué par la scintigraphie de la rate. La base pharmacologique de la scintigraphie splénique repose sur le fait que la rate est l'organe le plus efficace de l'organisme pour épurer le sang des hématies endommagées. Cette propriété permet d'obtenir une image de la rate et d'utiles renseignements sur différents états pathologiques de celle-ci (FISHER, 1967).

La technique d'utilisation du MHP a été mise au point par WAGNER (1964). Elle consiste à prélever quelques ml de sang au patient et de les verser dans une seringue contenant 100  $\mu\text{Ci}$  de MHP marqué au  $^{203}\text{Hg}$  ou 300  $\mu\text{Ci}$  de MHP marqué au  $^{197}\text{Au}$ , en présence de bromomercurihydroxypropane non marqué jouant le rôle d'entraîneur. Après agitation de la seringue pour assurer un parfait mélange, on réinjecte au patient ses propres hématies ainsi marquées. L'image de la rate est possible une à deux heures après l'injection, mais la scintigraphie n'est plus nette quatre ou cinq heures après.

La présence du MHP dans la rate, due à la séquestration dans cet organe des hématies fragilisées a été vérifiée par l'examen histologique du tissu splénique du lapin. Les animaux étaient sacrifiés après injection des hématies de lapin marquées au MHP. On pouvait voir de nombreuses hématies dans la pulpe de rate, spécifiquement dans les sinusoides.

Dans la rate, les globules rouges lysés libèrent le mercure ionique qui se retrouve dans les reins, le foie et les excréta. Une étude poussée des composés organo-mercuriels marqués et non diurétiques a permis d'établir que des doses de 1 mg de mercure par kilo d'ani-

mal n'étaient pas toxiques. Avec le MHP la quantité de mercure utilisée est inférieure à 0,1 mg de mercure par kilo d'animal. A ce niveau si bas, les réactions toxiques ne peuvent jamais se produire.

Les cellules marquées sont rapidement éliminées du sang par la rate, ce qui permet une très faible irradiation de l'organisme. Au niveau de la rate celle-ci n'est pas très conséquente puisque le mercure radioactif n'y reste que quelques heures. L'organe critique est le rein. Après la destruction des hématies dans la rate, l'excrétion urinaire de la radioactivité est d'environ 0,5 % de la dose injectée. On retrouve 4 heures après l'injection du mercure dans les selles, provenant probablement de l'excrétion biliaire. L'irradiation des reins est d'environ 70 rads pour 100 µCi de MHP marqué au  $^{203}\text{Hg}$ . L'emploi du  $^{197}\text{Hg}$  est préférable car la dose d'irradiation est réduite à 7 rads (CROLL, 1965).

Il est possible d'effectuer une image scintigraphique rénale dans les jours suivants (PARMENTIER, 1967).

### 3 - Utilisation des composés mercuriels dans la recherche biologique

HUGHES (1947) découvrit la fixation du chlorure mercurique avec l'albumine et montra que ce composé mercuriel pouvait être utilisé pour le dosage de l'albumine ainsi que pour déterminer le nombre de groupements SH de ces protéines.

HELLERMAN (1943) utilisa avec succès le parachloromercuribenzoate (CMB) pour étudier le rôle des groupements thiols dans la chimie enzymatique. BOYER (1954) démontra qu'une augmentation d'absorption à 250 mµ, accompagnant la formation de mercaptides pouvait être utilisés pour déterminer la quantité de groupements thiols. Cette méthode spectrophotométrique est cependant limitée car d'une part elle nécessite des quantités de l'ordre du mg de protéines et d'autre part des substances telle que l'adénine nucléotide qui absorbent à des longueurs d'onde très voisines de 250 mµ peuvent interférer. ERWIN (1968) transforma cette technique en utilisant le CMB marqué au  $^{14}\text{C}$  et en passant le mélange CMB-protéines sur une colonne de séphadex G-25 permettant ainsi de recueillir le  $^{14}\text{C}$ -CMB n'ayant pas réagi. Cette méthode devenait ainsi très sensible parfaitement reproductible et présentait un haut degré de spécificité pour les protéines examinées.

Un travail considérable a été fait en vue d'étudier la fixation des composés mercuriels sur les érythrocytes. JANDL et SIMMONS (1957) avaient étudié l'action du mercure sur l'agglutination des érythrocytes. L'action du mercure sur les échanges Na et K fut étudié par VINCENT et BLACKBURN (1958) l'action sur la perméabilité du glucose par WEED et ses collaborateurs (1962) ainsi que l'action sur la fragilité osmotique par WEED (1962). ROTHSTEIN (1959) montra que lorsque les érythrocytes sont mis en présence de mercure, leurs fonctions membra-

naires sont les premières atteintes, puis le mercure agit sur les fonctions métaboliques après s'être introduit dans la cellule.

WEED et ROTHSTEIN (1965) étudièrent la fixation du radionucléide  $^{203}\text{Hg}$  sur les érythrocytes. Ils constatèrent que l'équilibre était atteint au bout de trois à cinq minutes. Le mercure se fixait d'abord au niveau des groupements SH du stroma puis à d'autres sites de liaison de la cellule. La fraction totale de l'hématie liée au mercure au niveau du stroma est inversement proportionnelle à la concentration en Hg. Elle constitue environ 5 % du mercure dans l'érythrocyte quand il y a fixation maximum. Le glutathion (GSH) et l'hémoglobine sont des substances fortement liées par le mercure à l'intérieur de la cellule. Avant que toute l'activité du glutathion soit réduite, le mercure se fixe sur les sites de liaison de l'hémoglobine. La liaison à faible concentration du mercure aux hématies peut être affectée par la présence de substances liantes du liquide d'incubation dans lequel baigne les hématies. AZEN et JENSON (1968) ont montré la présence dans le liquide d'incubation des hématies de substances solubles auxquelles le mercure se fixait et ont noté des propriétés inhabituelles du mercure à faible concentration pour les hématies en présence de différents halogènes. La quantité de mercure liée aux érythrocytes dépend de la complexation du mercure avec des halogènes ainsi que de la constante d'équilibre de liaison du mercure aux substances intra ou extracellulaires.

CHAPITRE IV

LIAISON DES PROTEINES AUX ORGANO-MERCURIELS :

- STRUCTURE DES PROTEINES
- LIAISON DES COMPOSES MERCURIELS



## - LA PROTEINE NATIVE -

La connaissance de la structure tridimensionnelle des protéines précise la position spatiale des divers groupes d'une molécule protéique et permet ainsi une information importante pour la compréhension de ses propriétés fonctionnelles. Mais en solution les protéines ne sont pas des molécules rigides dont la structure est figée. Une protéine possède de nombreux degrés de liberté rotationnelle qui confèrent à l'ensemble de la molécule une certaine flexibilité. Sans atteindre la dénaturation, la conformation d'une protéine peut subir en fonction de différents facteurs certaines variations dans sa structure. Ces variations sont souvent mal définies et font des protéines un matériel instable.

Aussi avons-nous choisi d'appeler "protéine native" la protéine en solution dans le sérum puisque notre étude portera uniquement sur des protéines sériques. Dans le sérum, la protéine sérique évolue normalement et sa structure est dans une conformation dont on peut dire par définition qu'elle est native.

## - STRUCTURE DES PROTEINES -

D'après la nomenclature introduite par LINDERSTROM-LANG (1952), la structure des protéines peut se décomposer en termes de structures primaires, structure secondaire, structure tertiaire. BERNAL (1958) ajouta un quatrième type de structure qui résulte des interactions entre unités moléculaires.

### 1 - Structure primaire

La structure primaire est la séquence des acides aminés dans la chaîne polypeptidique, leur enchaînement étant assuré par des liaisons peptidiques covalentes entre



les groupements carboxyles et aminés avec élimination d'une molécule d'eau. Dans ces chaînes polypeptidiques, les acides aminés n'existent que sous la forme L. D'une protéine à une autre, l'agencement des acides aminés diffère ainsi que le nombre total d'acides aminés :

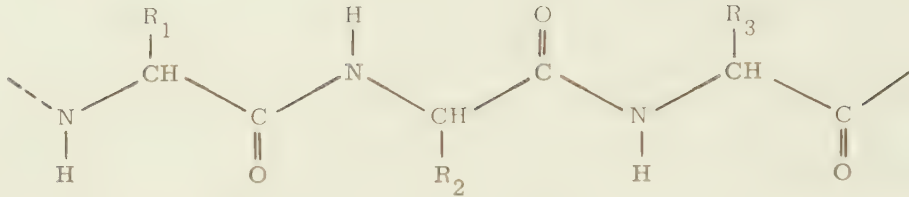


Schéma de la séquence polypeptidique  
formant la structure primaire

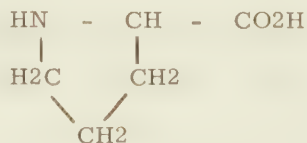
Si le nombre et la séquence des acides aminés dans la chaîne polypeptidique conditionne déjà pour une part l'activité spécifique des protéines, cette activité ne peut se manifester que si la molécule possède une configuration spatiale bien définie (structure secondaire et tertiaire) qui permet en particulier le rapprochement de certains groupes éloignés dans la séquence primaire.

## 2 - Structure secondaire

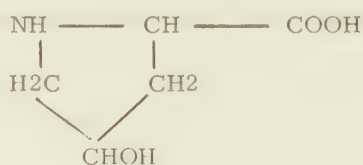
La structure secondaire est due à la formation de liaisons hydrogène entre les résidus N - H et C = O des liaisons peptidiques



Cette structure permet actuellement de retenir deux modèles pouvant exister dans la molécule protéique, en particulier l'hélice et les structures  $\beta$ . Ces deux modèles ont été déterminés avec précision par PAULING (1951) après qu'il eut défini très précisément les conditions d'angle et de longueur des liaisons. Pour que ces modèles existent il faut que les acides aminés aient la configuration L. Les chaînes latérales n'influencent pas la structure secondaire à l'exception de la proline



Par suite de sa nature planaire, de sa rigidité stéréochimique, de la perte de l'hydrogène sur l'azote en position  $\alpha$  lorsqu'il est impliqué dans une liaison peptidique, cet acide aminé ainsi que l'hydroxyproline



conditionne d'une manière unique le plissement de la chaîne peptidique, ce qui peut se traduire par une inversion du sens de la chaîne. PAULING et COREY ont montré par des mesures faites sur la glycyl-glycine que l'angle valentiel et la longueur d'une liaison correspondent à des valeurs exactes. Les atomes de la liaison peptidique doivent être coplanaires et la possibilité de résonance entre les deux formes ci-dessous favorise énergétiquement une configuration plane :



Les possibilités de rotation autour des liaisons définies par les angles  $\tau_{\text{NC}}$  et  $\tau_{\text{CC}'}$  déterminent la conformation locale de la chaîne polypeptidique (figure 6).

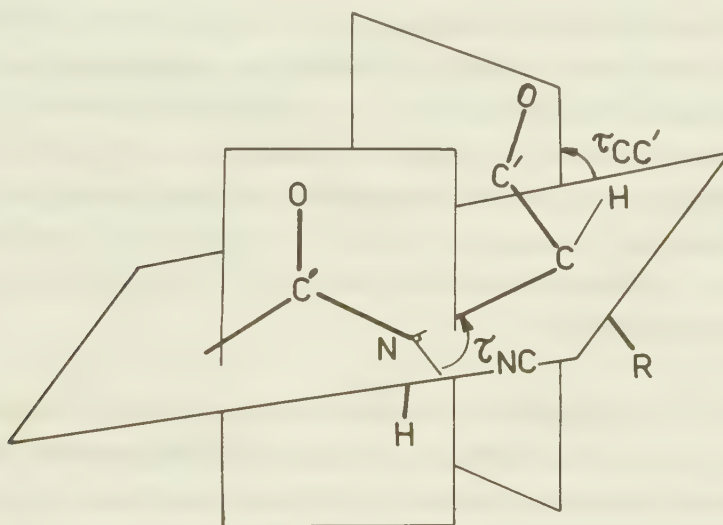


Figure 6 - Possibilité de rotation de la chaîne polypeptidique  
D'après YON (1969).

Afin d'obtenir une configuration énergétiquement stable, le modèle doit comporter le maximum de liaisons hydrogènes entre les groupes  $-\text{C}=\text{O} \dots \text{H}-\text{N}-$

Les structures sont représentées en feuillet plissé soit à chaînes antiparallèles, soit à chaînes parallèles. Ces deux types de structure ont été décrits dans les protéines fibreuses et dans certains polypeptides.

Le modèle en hélice  $\alpha$  a été observé dans le cas des protéines globulaires. On a pensé pendant longtemps que la chaîne polypeptidique des protéines globulaires était enroulée en hélice  $\alpha$  avec quelques discontinuités dans l'hélice dues à la présence de résidus proline ; on a

aussi suggéré que la molécule protéique était constituée de régions ordonnées en hélice  $\alpha$  et de régions désordonnées. Cette hypothèse permet de rendre compte du faible pourcentage d'hélice que révèlent les mesures de dispersion rotatoire pour un grand nombre de protéines en solution aqueuse. En fait, les molécules d'eau peuvent intervenir pour entrer en compétition avec les liaisons hydrogène intra-moléculaires et en former d'autres du type :  $-C=O \dots H-O-H$  et  $H_2O \dots H-N$ .

Pour décrire la structure secondaire des protéines globulaires le modèle de l'hélice  $\alpha$  s'est révélé insuffisant. Pour beaucoup de protéines, cette structure ne représente qu'une très faible partie de la molécule. On sait actuellement que d'autres structures ordonnées sont présentes dans les protéines globulaires, en particulier les structures  $\beta$ .

### 3 - Structure tertiaire

La chaîne polypeptidique déjà ordonnée en structure secondaire se replie sur elle-même pour former une molécule assez compacte, présentant une configuration spatiale bien déterminée. C'est cette géométrie tridimensionnelle de la molécule qui constitue la structure tertiaire. A partir des chaînes latérales, se forment un certain nombre de liaisons intramoléculaires, des liaisons covalentes comme les ponts disulfures et un grand nombre de liaisons de faible énergie : liaisons hydrogène, liaisons hydrophobes, liaisons salines. Ces différentes liaisons confèrent à la structure tertiaire sa stabilité et sont mises en jeu dans toute modification de conformation des molécules protéiques.

Une molécule protéique peut être constituée d'une ou plusieurs chaînes polypeptiques repliées entre elles. La structure tertiaire qui conditionne les propriétés des protéines et, en particulier leur activité biologique spécifique n'est généralement pas connue.

Cette géométrie spatiale est largement conditionnée par la structure primaire. La position des ponts disulfure impose certaines restrictions à la géométrie de la molécule, en même temps qu'une certaine cohésion à l'ensemble. Les résidus proline interrompent l'enroulement hélicoïdal. La position des résidus polaires et non polaires déterminent respectivement la formation de liaisons hydrogène. Enfin les interactions "hydrophobes" assurent une certaine stabilité à la molécule. Il est donc concevable qu'une séquence polypeptique donnée entraîne une structure unique de protéine native.

### 4 - Structure quaternaire

Les protéines sont souvent constituées de sous-unités ou protomères qui, dans des conditions déterminées, s'associent entre elles pour former des dimères ou des oligomères d'ordre supérieur.

## 5 - Conclusion

L'ensemble de ces différentes structures confèrent à la chaîne polypeptidique un morphisme bien déterminé et unique de protéine native. Toutefois la conformation des protéines natives, quoique organisée en un ensemble assez compact, ne se présente pas comme une structure totalement rigide, mais elle peut encore subir des modifications discrètes et réversibles. La relative stabilité des protéines natives assurée par des liaisons covalentes ou des ponts disulfures et par un grand nombre de liaisons de faible énergie est la résultante de forces de différente nature qui s'exercent entre les groupes d'atomes de la molécule d'une part et entre ces groupes et le solvant d'autre part.

## NATURE DES FORCES IMPLIQUEES DANS LA STABILITE DES PROTEINES NATIVES

Une protéine globulaire est un édifice macromoléculaire dont la stabilité de conformation est due à la résultante d'un grand nombre de forces attractives ou répulsives de natures diverses. Ces forces sont identiques à celles qui interviennent dans les associations entre molécules simples. Mais la complexité d'une molécule protéique est telle que de multiples groupes polaires et non polaires interviennent dans les interactions intramoléculaires. Simultanément des forces de toutes natures sont mises en jeu (KOSHLAND, 1963).

Ces forces sont des liaisons dont l'origine est pour toutes nettement électrostatiques. Nous les avons classées de la façon suivante :

- liaisons ioniques
- liaisons covalentes
- liaisons hydrogène
- liaisons hydrophobes
- liaisons de Van der Waals :
  - . interaction de Keesom
  - . interaction de Debye
  - . interaction de London
- répulsion à courte distance
- stabilisation par résonance

### 1 - Liaisons ioniques

Les liaisons ioniques sont des liaisons par transfert complet d'un ou de plusieurs électrons d'un atome à un autre. Ce transfert implique la création de charges et la cohésion du système se fait par attraction purement électrostatique.

Si les deux ions sont dans un milieu de forte constante diélectrique tel que l'eau, la force d'attraction entre eux deviendra beaucoup plus faible que celle qui s'exerce entre eux quand ils ne sont pas en solution.

Parmi les liaisons ioniques que nous trouvons au sein des protéines, nous distinguons :

- les interactions entre deux charges ou interactions coulombiennes
- l'interaction entre une charge et un dipôle permanent
- l'interaction dipôle-dipôle dont font partie les liaisons hydrogène.

## 2 - Liaisons covalentes

Une liaison covalente normale existe entre deux atomes lorsque deux électrons de spin opposé sont partagés entre les deux atomes. L'énergie de liaison peut être attribuée à la résonance des électrons entre les atomes, elle est importante et peut aller jusqu'à 100 k calories par mole. Pour qu'il y ait liaison covalente il n'est pas obligatoire que les deux atomes soient de même dimension. Une liaison de covalence entre deux atomes différents possède un caractère partiellement ionique, les électrons étant plus ou moins attirés par l'électronégativité d'un des atomes. Cette propriété est d'une très grande importance dans la réactivité chimique et dans toutes les interactions intermoléculaires, en particulier la formation de liaisons hydrogène.

Les liaisons covalentes existent dans les protéines au niveau des liaisons peptidiques de la structure primaire et dans les ponts disulfures qui interviennent dans la structure tertiaire.

Les liaisons covalentes par leur force de liaison beaucoup plus fortes que les autres types de liaison que nous allons décrire jouent un rôle très important, déterminant, dans la configuration spatiale des protéines.

## 3 - Liaisons hydrogène

Ces liaisons apparaissent quand deux atomes électronégatifs sont reliés par l'intermédiaire d'un atome d'hydrogène. Leur énergie de liaison est beaucoup plus faible que les liaisons covalentes, de l'ordre de 2 à 10 K calories par mole. Elles sont dues aux interactions électrostatiques entre deux dipôles. Par exemple entre un atome d'oxygène et un atome d'azote



la liaison O - H étant essentiellement covalente.

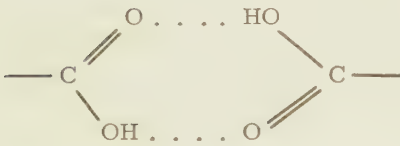
L'hydrogène est constitué par un proton autour duquel gravite un électron. Quand l'atome perd son électron au cours d'une liaison covalente, le proton restant exerce une action électrostatique puissante sur l'ion négatif puisqu'il ne lui reste aucune enveloppe électronique permettant ainsi au nuage électronique d'un autre atome de s'approcher très près de ce noyau

d'hydrogène. Il en résulte une attraction énergétique. Le pouvoir attractif de ce proton pour une autre charge négative dépend de la répartition des électrons de l'ion négatif auquel il est lié. Le proton lié à l'azote et surtout à l'oxygène n'est que partiellement neutralisé, ce qui lui permet d'attirer encore un anion. Cette liaison hydrogène ne pourra s'établir entre la molécule covalente et d'autres molécules que si celles-ci présentent des atomes suffisamment électronégatifs.

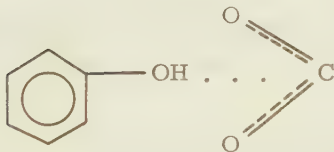
SCHERAGA (1963) inclut les liaisons ioniques dans les liaisons hydrogène ce qui lui permet de concevoir l'existence de plusieurs sortes de liaisons hydrogènes dans les protéines :



1) Liaison hydrogène entre deux groupes peptidiques.



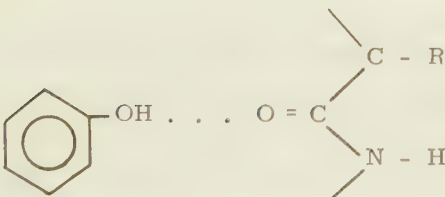
2) Liaison hydrogène entre des groupes neutres de chaînes latérales.



3) Liaison hydrogène entre un groupe neutre et un groupe chargé de chaîne latérale



4) Liaison hydrogène entre deux groupes chargés de chaînes latérales.



5) Liaison hydrogène entre une chaîne latérale et un groupe peptidique.

Les liaisons hydrogène bien qu'à caractère ionique marqué présentent également un léger caractère covalent en raison de la mise en commun d'électrons par chacun des deux atomes entre lesquels se trouve l'atome d'hydrogène. Par suite de ce caractère covalent, les trois atomes doivent être sensiblement alignés.

Au sein des protéines il faut distinguer d'une part les liaisons hydrogène intracaténaïres entre les groupes  $\text{C} = \text{O}$  et  $\text{H} - \text{N}$  de la chaîne principale qui stabilisent les parties héli-

coïdales de la protéine ou les structures (ce sont les liaisons hydrogène de la structure secondaire) et d'autre part, les liaisons hydrogène entre les résidus polaires des amino acides des chaînes latérales (ce sont les liaisons hydrogène de la structure tertiaire).

#### 4 - Les liaisons hydrophobes

Ces liaisons sont dues essentiellement à la présence du solvant en particulier de l'eau. D'après NEMETHY et SHERAGA (1962), une liaison hydrophobique se forme quand deux ou plusieurs groupes non polaires des chaînes latérales s'approchent les uns des autres suffisamment pour être liés entre eux par des forces de Van der Waals et éliminer ainsi les molécules d'eau qui les entourent.

La plupart des protéines comme le souligne TRISTAM (1963) contiennent de 35 à 50 % environ de résidus portant une chaîne latérale non polaire, ou une chaîne latérale qui se comporte comme un groupe non polaire.

Les tableaux III et IV réunissent dans les premiers les acides aminés porteurs de chaînes latérales non polaires, dans le deuxième les acides aminés porteurs de chaînes latérales polaires pouvant se comporter comme des groupes non polaires.

Des portions non polaires de longues chaînes latérales portant des groupes polaires tels que l'acide glutamique et la lysine peuvent participer à des interactions hydrophobes.

Pour KAUFMANN (1959) les groupes non polaires ne réagissent entre eux et avec le solvant que par des forces de Van der Waals. Pour ce même auteur l'interaction des groupes non polaires avec l'eau est thermodynamiquement défavorable. C'est donc une tendance thermodynamique qui pousse les groupes non polaires à entrer en contact les uns avec les autres, à s'associer et ainsi entraîne une diminution de leurs interactions avec l'eau. Les travaux de SHERAGA (1962) confirmèrent l'hypothèse de KAUFMANN sur l'effet thermodynamique de ces réactions en donnant différents exemples de liaison hydrophobes de forces maxima et les paramètres thermodynamiques correspondant à toutes les liaisons hydrophobes possibles dans une protéine.

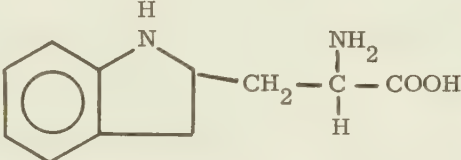
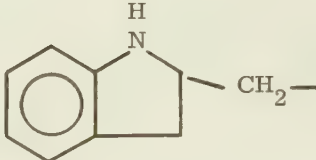
TABLEAU III

Acides aminés porteurs de chaînes latérales non polaires

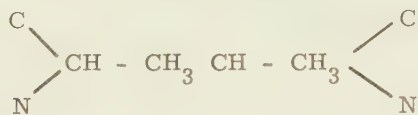
| Acide aminé   | Structure                                                                                                                                                                                                                                               | Chaîne latérale non polaires                                                                                                                                      |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ALANINE       | $\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{CH}_3 - \text{C} - \text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$                                                                                                                                                | - CH <sub>3</sub>                                                                                                                                                 |
| VALINE        | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array} - \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{C} - \text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$               | - CH $\begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$                                                                                  |
| LEUCINE       | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH}_3 \end{array} - \text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{C} - \text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$ | - CH <sub>2</sub> - CH $\begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_3 \end{array}$                                                                |
| ISOLEUCINE    | $\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagdown \\ \text{CH} \\ \diagup \\ \text{C}_2\text{H}_5 \end{array} - \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{C} - \text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$                                                      | - CH $\begin{array}{l} \diagup \text{CH}_3 \\ \diagdown \text{CH}_2 - \text{CH}_3 \end{array}$                                                                    |
| PROLINE       | $\begin{array}{c} \text{NH} - \text{CH} - \text{COOH} \\   \quad   \\ \text{H}_2\text{C} \quad \text{CH}_2 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{CH}_2 \end{array}$                                                                                       | - N $\begin{array}{l} \diagup \text{CH} \\ \diagdown \text{CH}_2 \end{array}$<br>- HC $\begin{array}{l} \diagup \text{CH}_2 \\ \diagdown \text{CH}_2 \end{array}$ |
| PHENYLALANINE | $\text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_2 - \begin{array}{c} \text{NH}_2 \\   \\ \text{C} - \text{COOH} \\   \\ \text{H} \end{array}$                                                                                                                         | - CH <sub>2</sub> - C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>                                                                                                                 |

TABLEAU IV

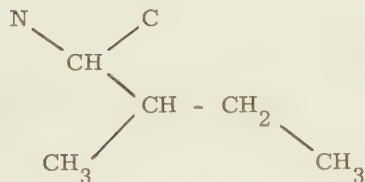
Acides aminés porteurs de chaînes latérales polaires pouvant se  
comporter comme des groupes non polaires

| Acide aminé | Structure                                                                                                                 | Chaîne latérale polaire                                                             |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| METHIONINE  | $\text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}} - \text{COOH}$ | $-\text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_3$                               |
| CYSTEINE    | $\text{HS} - \text{CH}_2 - \underset{\text{H}}{\overset{\text{NH}_2}{\text{C}}} - \text{COOH}$                            | $-\text{CH}_2 - \text{SH}$                                                          |
| CYSTINE     | $\text{Cy} - \text{S} - \text{S} - \text{Cy}$                                                                             | $-\text{CH}_2 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2$                                  |
| TRYPTOPHANE |                                         |  |

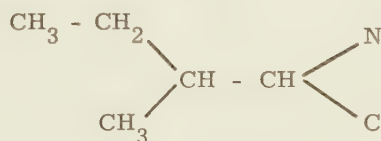
Exemples de liaisons hydrophobes entre paires de chaînes latérales présentant l'interaction maximale :



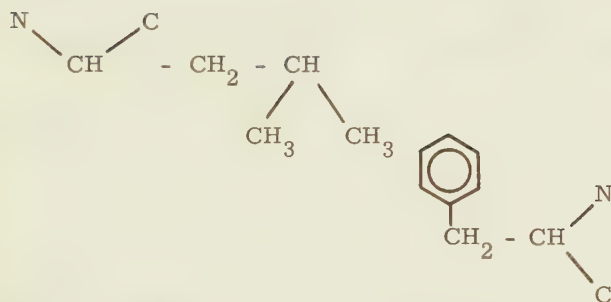
1) Liaison alanine-alanine



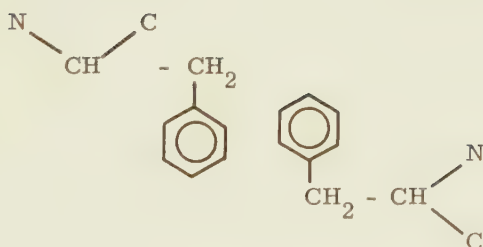
## 2) Liaison isoleucine-isoleucine



### 3) Liaison phénylalanine-isoleucine



4) Liaison phénylalanine-phénylalanine.



Ainsi dans une protéine, les résidus non polaires ont tendance à se réunir afin d'éviter la phase aqueuse et se regroupent vers le centre de la protéine, tandis que les résidus polaires se situent à la surface de la protéine. Cette conformation masque dans les zones hydrophobes de la protéine certains réactifs et explique le titrage lent des groupements thiols ou de certains groupes ionisables entraînés dans les régions hydrophobes de la molécules lors du repliement de la chaîne peptidique. Elle provoque aussi en fonction du pH la naissance de pK anormaux de certains groupes par suite d'une sorte de retard à la dissociation ou à l'association d'un proton avec un groupe masqué.

Ces liaisons ont un rôle très important dans la stabilité de la structure native des protéines. Bien qu'elles correspondent à des interactions de faible énergie, leur contribution dans la stabilité conformationnelle des protéines peut s'expliquer à la fois par leurs propriétés et par leur nombre. D'une part elles jouent un rôle stabilisateur des liaisons hydrogène, d'autre part elles interviennent en grand nombre créant de véritables régions hydrophobes à l'intérieur de la molécule et imprimant une structure assez compacte aux protéines globulaires en solution.

## 5 - Forces de Van der Waals

Les forces de Van der Waals sont caractérisées par la petitesse des énergies mises en jeu, inférieures dans la plupart des cas à 2 Kcalories par molécule. Elles sont de trois types essentiels, peu différents d'ailleurs dans leur essence (PANNETIER, 1969).

### 5.1 - Interaction de Keesom

L'interaction de Keesom correspond à une interaction entre deux dipôles permanents. A la différence de la liaison hydrogène comme l'encombrement spatial aux extrémités des dipôles empêche une trop grande approche des centres de signe opposé, l'attraction demeure faible et la liaison ne peut avoir qu'un caractère très lâche.

### 5.2 - Interaction de Debye

Ces interactions correspondent à une attraction entre un dipôle permanent et le dipôle induit par le premier dans une molécule voisine (figure 7).

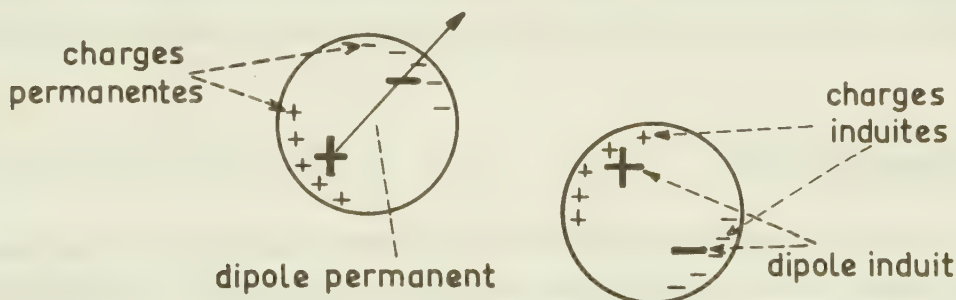


Figure 7 - Interaction de Debye - Dipole permanent - Dipole induit

### 5.3 - Interaction de London

Ces forces sont des interactions entre groupes non polaires dues à l'induction mutuelle de dipôles fluctuants. Une molécule (1) (figure 8) symétrique possède à chaque instant un moment dipolaire par suite des fluctuations dans les positions relatives du noyau et des électrons



## IMPORTANCE DU SOLVANT DANS LEQUEL SE TROUVENT LES PROTEINES

Dans toutes les interactions de faible énergie qui contribuent à assurer à une protéine une structure tridimensionnelle précise, le rôle du solvant est déterminant. La structure organisée que présentent les protéines "natives" est fonction des propriétés du solvant. Les diverses liaisons non covalentes qui contribuent à la stabilité conformationnelle des protéines en solution résultent non seulement des interactions entre les groupes polaires ou entre les groupes non polaires de la molécule, mais aussi des interactions entre ces groupes et le solvant. La stabilité des liaisons H dépend de la présence des molécules d'eau. Les liaisons hydrophobes en dépendent encore plus étroitement. Les interactions entre les protéines et l'eau qui interviennent pour une large part dans la stabilisation et la géométrie des protéines sont encore mal connues.

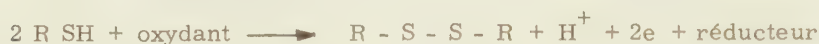
Dans les protéines en solution, les résidus non polaires se trouvent à l'intérieur de la molécule et les résidus polaires sont exposés à l'extérieur en contact avec le solvant. Les résidus polaires ont en effet une affinité très faible pour "le milieu interne" pratiquement anhydre de la protéine et de même les résidus apolaires ont une solubilité extrêmement limitée à l'extérieur.

### - Les groupements SH et les ponts S - S

La séquence des acides aminés qui constituent la chaîne polypeptidique d'une protéine peut comporter des résidus cystéinyles dont la terminaison thiol est douée suivant sa position dans la protéine d'une plus ou moins grande réactivité chimique. BOYER (1959) classa les protéines globulaires en deux catégories : celles qui possèdent des ponts S - S et celles qui possèdent des groupements libres. Certaines peu nombreuses ont des groupes des deux types dans la même molécule. Par exemple, l'albumine comporte 17 ponts disulfures intrapeptidiques et un seul groupe thiol libre (POLONOWSKI, 1968).

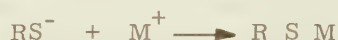
### - Rôle des groupes sulfhydriles

CECIL (1963) considère successivement deux catégories de groupes sulfhydriles : les groupes réactifs et ceux qui ne le sont pas. Les groupes SH réactifs dans les protéines sont ceux qui se comportent vis-à-vis des réactifs des groupes comme de simples thiols. Ils présentent une grande réactivité chimique. Ils peuvent s'oxyder dans des conditions assez douces en formant des liaisons disulfures :



Parmi leurs propriétés les plus spécifiques et peut-être les plus utilisées pour l'identification des groupes dans les protéines, il faut mentionner leur aptitude à former des mercaptans. Ils ont une grande affinité pour certains cations métalliques avec lesquels ils forment des complexes légèrement dissociés.

La réaction d'équilibre est la suivante :



Il existe dans les protéines d'autres groupes que les thiols qui sont capables de réagir avec les métaux lourds, ce sont les groupes imidazoles, carboxyliques et aminés. Mais les groupes SH ayant une plus grande affinité pour les métaux réagissent d'abord s'ils ne sont pas masqués.

Les groupes sulphydriles non réactifs sont ceux qui ne présentent qu'une très faible réactivité ou même sont totalement inaccessibles dans la protéine native. Ils sont masqués à l'intérieur de la molécule protéique : soit ils se trouvent enfouis dans une région "hydrophobe" de la molécule participant à une interaction avec un autre ion non polaire, soit ils contractent une liaison hydrophobe avec un groupe accepteur ou un groupe donneur suivant qu'ils se trouvent sous la forme SH ou  $\text{S}^-$ .

### - Rôle des ponts disulfures

Les liaisons disulfures S - S au sein des protéines ont un rôle essentiellement structural. Leur présence dans une molécule protéique par suite de leur caractère covalent et dans des conditions stériques qu'elles imposent doit contribuer pour une part importante à la géométrie spatiale de l'édifice macromoléculaire en restreignant les possibilités de repliement de la chaîne primaire et en lui imposant une certaine contrainte. Ces liaisons sont stables et peu réactives par rapport aux groupements SH. Elles réagissent surtout en milieu alcalin où elles sont hydrolysées (BROWN, 1969).

## LIAISON DES PROTEINES AVEC LES COMPOSES ORGANO-MERCURIELS

Quand dans un complexe l'atome central est lié à ses voisins immédiats par des liaisons covalentes comme par exemple dans le cas d'un atome métallique acceptant une paire d'électrons de chaque atome non métallique, il est habituel d'appeler ce dernier le donneur et le premier l'accepteur. L'atome non métallique est appelé aussi atome coordinant et la liaison entre lui et l'atome métallique est une liaison coordonnée. Cependant l'atome métallique lui-même donne des électrons à la liaison comme s'il faisait une liaison. Une convention plus généralement utilisée et qui est préférable car elle évite toute précision sur la nature de la liaison, est d'appeler l'ion négatif ou la molécule polaire liée à l'atome métallique, le Ligand (L) et la liaison entre eux Métal-Ligand (M - L).

Les types de ligands les plus courants sont des ions négatifs mono ou polyatomiques et des molécules polaires neutres. Ces dernières ont presque toujours un ou plusieurs doublets électroniques libres, comme  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CO}$ . Les déterminations de structure ont montré, avec très peu d'exception que les molécules polaires ligandes sont orientées de façon qu'un doublet libre soit dirigé vers l'ion métallique. Certains ligands sont reliés à l'atome métallique par plusieurs donneurs et forment un anneau hétérocyclique.

Ce type d'anneau porte le nom de "Chelate" et la molécule ou l'ion à partir duquel il est formé est l'agent chélatant. Le processus de formation du Chélate est appelé chélation. Les complexes à ligands chélatants sont plus stables que ceux qui sont formés par des molécules ayant les mêmes groupes fonctionnels mais à raison d'un seul par molécule. Cette stabilité supplémentaire est due à un effet d'entropie. En effet, dans la réaction entre un ion métallique et deux molécules ligandes indépendantes pour former un complexe  $\text{ML}_2$ , la variation d'entropie comprend un terme qui rend compte du fait que les deux ligands perdent leur entropie de translation : avant la réaction, les trois molécules en jeu peuvent se déplacer de façon indépendante, après elles sont contraintes de se déplacer ensemble. Dans la réaction correspondante d'une molécule chélatante, l'entropie perdue correspond à la liberté de translation d'une seule molécule puisque les deux groupes fonctionnels du ligand sont liés à l'origine (figure 9).

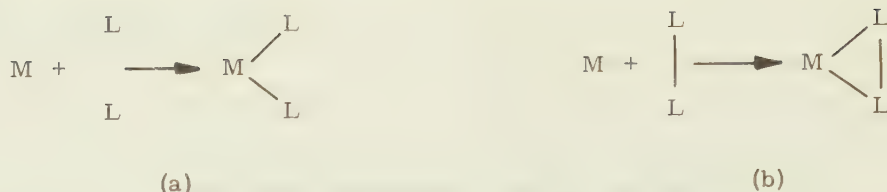


Figure 9 - Effet de la chelation sur la variation d'entropie de translation au cours de la formation du complexe.

- (a) Le mouvement de translation de trois molécules indépendantes est remplacé par celui d'un complexe.
- (b) Il n'ya que deux mouvements de translation indépendants possibles même avant la formation du complexe.

Dépendant du type d'hybridation des liaisons auxquelles l'ion métallique choisi est prédisposé, cet ion tendra à se combiner avec un maximum de ligands simples 2, 4 ou 6. Le ligand simple contient un seul atome donneur, habituellement un atome de O, N ou S avec une paire d'électrons libres. Certains ions peuvent supporter une transition d'une forme à une autre. Pour l'ion mercurique  $\text{Hg}^{++}$  nous devons avoir un complexe linéaire avec deux ligands ou un complexe tétraédrique avec quatre ligands. Dans le premier cas la liaison avec les deux ligands est plus forte qu'avec quatre.

Dans la combinaison de petites molécules et des protéines, deux types de relations sont importants (PUTNAM, 1965) :

- L'interaction des petites molécules et des sites actifs des protéines.
- Les interactions entre les chaînes des protéines. Ces dernières ont une signification importante dans le maintien de la structure tri-dimensionnelle des sites actifs et entraînent une flexibilité qui doit jouer un rôle clef dans la facilité d'action des protéines. La nature des forces opérant entre les protéines et les petites molécules sont présumées être fondamentalement semblables aux forces opérant entre les chaînes latérales. Nous aurons donc entre les composés organo-mercuriels et les protéines des possibilités de liaisons identiques à celles que nous avons déjà citées.

#### 1 - Liaison des protéines aux composés mercuriels

La liaison des protéines aux composés organo-mercuriels est encore mal définie, car il est très difficile de connaître exactement à quel radical de la protéine l'ion métallique est lié.

De très nombreuses recherches ont eu lieu à ce sujet et pour beaucoup d'auteurs la fixation de l'ion mercurique aux protéines se ferait au niveau de groupement sulphydrile. Pour déterminer les groupements-thiols des protéines, les meilleurs réactifs sont ceux qui permettent la formation de mercaptides les plus difficilement dissociables. Les organo-mercuriels du type  $R - Hg - X$  furent remarqués comme permettant les meilleurs dosages.

L'action d'un composé organo-mercuriel avec un thio-acide de type  $R - SH$  se fait suivant l'équation :

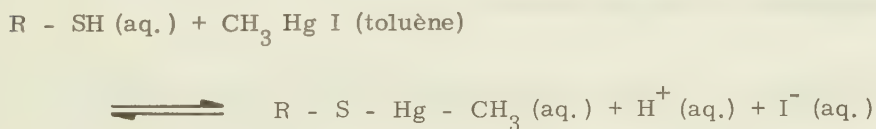


WEBB (1964) ayant vérifié que les dérivés mercuriels ne réagissaient sur les ponts disulfures que dans des cas très particuliers, démontra le principe suivant : les composés mercuriels pouvaient être utilisés en biochimie pour déterminer des quantités de groupements thiols, pour vérifier l'activité d'enzymes dont les réactions métaboliques dépendaient de groupements sulphydriles, pour estimer le nombre et la réactivité de ces groupements dans les protéines et enfin pour les localiser dans les tissus et les cellules.

## 2 - Liaison de l'albumine et des dérivés mercuriels

HUGUES (1947) découvrit que lorsqu'il ajoutait du chlorure mercurique à de la sérum albumine humaine purifiée, il obtenait une fraction cristalline qui était formée d'un atome de mercure pour deux molécules d'albumine et qui contenait environ 70 % de l'albumine originelle. En traitant ce nouveau composé avec de la cystéine, il remarqua que le dimère se décomposait et qu'il retrouvait l'albumine initiale.

HUGUES (1947) démontra que la liaison  $Hg$  - protéines se faisait au niveau d'un groupement  $SH$  libre de la protéine en étudiant la réaction à l'aide d'un réactif monofonctionnel, l'iodure de méthyl-mercure  $CH_3 - Hg - I$ . La mesure de la distribution de l'iodure de méthyl-mercure entre le toluène dans lequel il est soluble et une solution aqueuse d'albumine permet d'écrire la réaction suivante :



La présence de l'iode permet d'oxyder d'autres sites de liaisons que les groupements thiols et ainsi empêche toute fixation sur ces sites. En détruisant dans cette même expérience les groupements sulphydriles, HUGUES vérifia que l'ion  $CH_3 Hg^+$  ne se fixait plus sur l'albumine. Ainsi à basse concentration d'iodure de méthyl mercure, le seul point de liaison de l'albumine

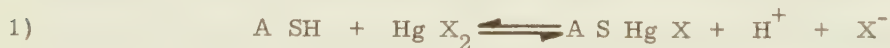
pour l'ion mercurique est le groupement SH. SCATCHARD (1954) montra que si l'on remplace l'iodure par le nitrate de méthyl mercure, le composé organo-mercuriel peut se fixer sur d'autres sites de liaisons que les groupements thiols.

A cette albumine porteuse d'un groupement SH libre, HUGUES donna le nom de "mercaptalbumine". Cette protéine présentait l'intérêt d'être une protéine connue et de contenir un radical actif, présentant une grande affinité pour les métaux lourds. L'affinité de l'atome de soufre, chargé négativement, pour les ions métalliques lourds est telle que si l'on augmente la concentration en ion mercurique à partir de zéro les groupes SH sont saturés par le métal avant qu'il ne se soit formé un complexe appréciable avec d'autres groupes dans la protéine pouvant réagir aussi avec le métal.

SAROFF (1953) confirma les travaux de HUGUES en montrant par une méthode de titration ampérométrique que à pH 7,5 la constante d'association K de la liaison entre le groupement SH de l'albumine et l'ion mercurique était très grande. L'ion mercurique fixé à ce seul site, apparemment n'était ni réduit, ni dissocié au contact de la goutte d'électrode. Tandis que les autres modes de liaison avec l'ion  $\text{Hg}^{++}$  étaient soit réduits, soit dissociés très rapidement.

La cinétique de cette réaction : mercaptalbumine humaine et sel mercurique a été étudiée par EDELHOCH (1953). Une réaction similaire avec un organo mercuriel bifonctionnel ( $\text{X Hg R Hg X}$ ) a été étudiée par EDSALL (1954).

D'après ces auteurs, l'équation de réaction s'écrit :



A - SH représente l'albumine

Hg -  $\text{X}_2$  représente le composé mercuriel.

Dans la troisième équation l'excès de sel mercuriel détruit le dimère formé.

La formation du dimère a été étudiée en ajoutant de très faibles quantités de composés mercuriels à la solution de mercaptalbumine. Les réactions 1 et 3 se font très rapidement tandis que la réaction 2 au cours de laquelle se forme le dimère est limitée et secondaire. Le dimère ne pourrait se former que pour un rapport  $\text{Hg}^{++}/\text{ASH}$  compris entre 0 et 1. Le maximum

de formation du dimère se situe à pH 4,25. Les anions ayant une grande affinité pour le mercure peuvent diminuer la constante d'équilibre du dimère.

### 3 - Liaisons d'enzymes et des composés mercuriels

De nombreux enzymes classés comme enzymes actifs par leurs groupements SH peuvent former des complexes mercaptides avec l'ion mercurique  $\text{Hg}^{++}$  ou  $\text{R} - \text{Hg}^+$  d'une façon analogue à la mercaptalbumine.

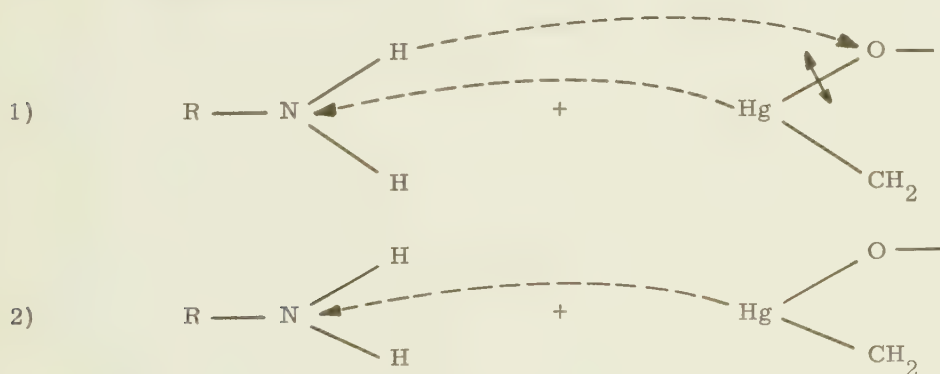
SMITH (1954) et ses collaborateurs à partir de solutions équimolaires de  $\text{HgCl}_2$  et d'enzymes protéolytiques, constatèrent la formation d'un dimère composé de deux molécules d'enzyme et d'un ion mercurique. Ils constatèrent aussi que l'activité enzymatique due au groupement thiol avait disparu et qu'elle réapparaissait en présence de cystéine.

Ce même auteur (1955) étudiant l'interaction de l'ion mercurique avec le lysozyme du latex de "papaya", enzyme connu pour avoir un groupement thiol par molécule, constata que dans ce cas il fallait trois ions mercuriques pour une molécule protéine. Il suggéra que d'autres sites de liaison pouvaient intervenir, en particulier les groupements imidazole et les radicaux histidine. La possibilité de formation de chélates entre l'ion mercurique et les protéines par fixation sur d'autres sites de liaison que les groupements thiols n'est pas à exclure.

Pour SHULMANN (1964) le mercure a une préférence spécifique pour les groupements donneurs d'ions  $\text{S}^-$  mais peut aussi former des complexes avec l'azote. En particulier, il peut donner des liaisons fortes avec l'azote des groupes  $-\text{NH}-$  des protéines.

Cette liaison peut se faire des deux façons suivantes :

- avec les organo-mercuriels :



1) Fixation des organo-mercuriels sur des groupements aminés d'une protéine.

2) Formation d'un ammonium quaternaire.

GURD (1956) a montré que l'histidine pouvait se combiner au mercure de plusieurs façons. Mais ses études portaient sur l'histidine isolée.

Actuellement on connaît mal encore la fixation des composés mercuriels sur des acides aminés porteurs de groupements aminés disponibles au sein d'une protéine tels que la Lysine, l'Arginine, l'Histidine. Il faut tenir compte du fait que les constantes de dissociation des acides aminés au sein de la protéine sont modifiées par rapport à celle des acides aminés isolés. L'influence des charges portées par les acides aminés maintenus dans leur voisinage dans une position fixe par suite de leur appartenance à la même molécule entraîne une modification assez importante de ces constantes de dissociation.

#### - CONCLUSION

Toutes ces considérations sur la structure des protéines, les différentes forces impliquées dans la stabilité des protéines natives, ainsi que les divers types de liaison possibles entre les composés mercuriels et les protéines nous permettront d'analyser nos résultats personnels.

DEUXIEME PARTIE

---

TRAVAUX PERSONNELS



A l'aide des moyens d'études ci-après : dialyse, électrophorèse, chromatographie sur gel de dextrane, immunoelectrophorèse, nous avons cherché à démontrer in vitro une liaison éventuelle entre les protéines sériques et deux composés organo-mercuriels : le MHP et la Chlormérodrene. A l'aide d'un thioloprive le N-ETHYL-MALEIMIDE nous avons cherché à donner une explication à cette liaison.

Nous envisagerons successivement :

- 1 - l'étude de la fixation du MHP par les protéines sériques,
- 2 - l'étude de la fixation de la Chlormérodrene par les protéines sériques,
- 3 - l'étude de la liaison des protéines sériques avec certains sels mercuriels ionisables, le chlorure mercurique et l'acétate mercurique,
  - l'étude de la liaison de certains acides aminés avec le MHP,
- 4 - l'action d'un thioloprive, le N-éthyl-maléimide sur la liaison protéine-composé mercuriel.

Dans un dernier chapitre nous discuterons de la liaison des protéines avec les composés mercuriels en essayant de lui donner une explication.



CHAPITRE V

---

METHODES D'ETUDES



Les méthodes d'études des phénomènes de transport par les protéines du plasma sanguin mettent en oeuvre des méthodes basées d'une part sur un changement des propriétés du corps véhiculé : mesure de solubilité, analyse de partage, équilibre de dialyse, ultracentrifugation, filtration sur gel de dextrane, échanges d'ion, polarographie, électrophorèse, spectrophotométrie, mesure de l'activité biologique et d'autre part sur un changement des propriétés de la protéine vectrice : précipitation, électrophorèse, spectrophotométrie, potentiométrie (WELIN, 1961).

Pour toutes ces méthodes, la difficulté réside dans la détection de la molécule transportée. Nous avons évité cet écueil en utilisant des composés mercuriels marqués aux radionucléides  $^{197}\text{Hg}$  ou  $^{203}\text{Hg}$ .

L'emploi des radioéléments en effet permet aisément de suivre le devenir d'une molécule ou d'une particule et diminue considérablement les limites de la détection. Les produits que nous avons utilisés, avaient une activité spécifique suffisante pour que nous ayons pu déceler jusqu'à  $10^{-6}$  mg de mercure.

Au cours de notre travail, nous avons utilisé les techniques suivantes :

- 1 - Une technique de dialyse destinée à montrer que dans des conditions les plus physiologiques possibles il y a bien fixation des composés organo-mercuriels par les protéines,
- 2 - Trois techniques d'électrophorèse sur support destinées à séparer les fractions plasmatiques afin de préciser le lieu de fixation des composés organo-mercuriels,
- 3 - Une technique de filtration sur gel de dextrane permettant de séparer les différentes fractions protéiques sans agir sur la liaison des organo-mercuriels aux protéines,
- 4 - Une technique d'immunoélectrophorèse afin de préciser sur quelles protéines exactement les composés organo-mercuriels se fixaient.

#### A - Description des techniques d'études

##### 1 - Dialyse

Dans un premier temps nous avons cherché à savoir si dans des conditions aussi voisines que possible des conditions physiologiques, nous avions une fixation des composés organo-mercuriels sur les protéines sériques. La méthode de dialyse nous a paru le mieux con-

venir à cette recherche. Nous avons donc appliqué une méthode de comptage par scintillation en cristal creux à la technique de dialyse.

#### - Principe

Le sérum mélangé à une quantité déterminée de composé organo-mercuriel est mis à dialyser dans une solution tampon choisie. Toutes les 24 heures et ceci pendant 4 jours on prélève un échantillon de tampon afin d'en déceler la radioactivité.

#### - Technique

Le sérum mis en contact avec le composé mercuriel est soumis à un comptage de la radioactivité dans un scintillateur à cristal creux, le mélange est ensuite versé dans un sac de cellophane pour dialyse, lui-même placé dans une solution tampon de pression osmotique très faible par rapport au mélange sérum-organo mercuriel. L'ensemble est agité très doucement à l'aide d'un agitateur magnétique à la température de 37°C.

16 heures, 24 heures, 40 heures, 4 jours après on prélève un échantillon de la solution tampon, dans lequel on recherche la quantité de mercure qui aurait pu dialyser, par une mesure de la radioactivité dans le même scintillateur à cristal creux que précédemment.

Ainsi par cette méthode nous pourrions confirmer s'il y a bien une liaison des composés organo-mercuriels par les protéines.

### 2 - Fractionnement électrophorétique du sérum mis en présence avec un composé organo-mercuriel

La méthode d'électrophorèse sur support donne un fractionnement satisfaisant du sérum nous permettant de déterminer sur quel groupe de protéines le composé organo-mercuriel se fixe. Mais comme nous le verrons, cette technique ne se suffit pas à elle-même, elle présente plusieurs inconvénients. La nature du support, la nature du tampon et son pH ne sont pas sans agir sur la liaison protéine-organo mercuriel (BROWN, 1959).

#### - Principe

Après incubation in vitro du composé organo-mercuriel avec le sérum, celui-ci est soumis à une séparation électrophorétique. Le repérage des protéines est obtenu par coloration au noir Amido, ou au Ponceau S, la répartition de la radioactivité est appréciée par autoradiographie des bandes d'électrophorèse. La comparaison après lecture densitométrique de l'électrophorégramme et de l'autoradiogramme précise l'affinité des fractions protéiques pour le composé organo-mercuriel.

- Les réactifs

1 - Les organo-mercuriels

. L'acétyl-mercuri-hydroxy-propane ou MHP, marqué avec les radionuclides  $^{203}\text{Hg}$  ou  $^{197}\text{Hg}$ .

. La chlormérodine : marquée également soit avec  $^{203}\text{Hg}$  ou  $^{197}\text{Hg}$ .

2 - Les sérums

Nous avons utilisé des sérums de Lapin et d'Homme. Le sang après avoir été prélevé par ponction veineuse est laissé coaguler. Le sérum est alors séparé par centrifugation à petite vitesse : 3 000 tours/seconde pendant 10 minutes.

a) Dosage des protéines

Le dosage des protéines a été fait par spectrophotométrie à 280 mμ.

Toutes les protéines, excepté la protamine présentent une bande d'absorption en lumière ultra-violette à 280 mμ. Ce phénomène est dû à la présence de noyaux benzéniques de la tyrosine, de la phénylalanine et du tryptophane. BARRE et LABAT (1959) ont montré que la mesure de l'absorption en lumière ultra-violette n'était pas une méthode suffisamment rigoureuse pour doser exactement les protéines totales d'un sérum. Pour la précision de nos expériences, nous avons estimé que cette méthode de dosage était suffisante.

La courbe reliant la densité optique à la teneur en protides a été étalonnée à partir de cinq sérums de Lapin dont les protides ont été dosés par gravimétrie après précipitation par le mélange alcool-éther chaud selon la technique de FLEURY (1951).

. Préparation de la courbe d'étalonnage

Par gravimétrie nous mesurons le taux de protides de 1 ml de sérum de Lapin. Ce même sérum est dilué en quatre fractions :

$$\frac{1}{100} \qquad \frac{0,75}{100} \qquad \frac{0,50}{100} \qquad \frac{0,25}{100}$$

pour chacune de ces dilutions nous mesurons la densité optique correspondante. Connaissant la concentration en protides de 1 ml de sérum, nous pouvons connaître pour chaque densité optique le poids de protéines correspondant. Nous obtenons ainsi quatre points de la courbe étalon. Afin de diminuer les erreurs inhérentes à l'expérience nous avons opéré sur cinq sérums différents de Lapin.

TABLEAU V

Dosage gravimétrique et mesure densitométrique des  
protéines sériques de Lapin

| Sérum de<br>Lapin | Poids en g de protéines<br>dans 1 ml de sérum | Densité optique |                    |                    |                    |
|-------------------|-----------------------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                   |                                               | $\frac{1}{100}$ | $\frac{0,75}{100}$ | $\frac{0,50}{100}$ | $\frac{0,25}{100}$ |
| 1                 | 0,0680                                        | 58              | 42                 | 33                 | 14                 |
| 2                 | 0,0608                                        | 55              | 41                 | 29                 | 14,5               |
| 3                 | 0,0585                                        | 50              | 38,5               | 27,5               | 13                 |
| 4                 | 0,0729                                        | 61              | 47,5               | 33,5               | 17,5               |
| 5                 | 0,0683                                        | 58              | 43                 | 28,5               | 13,5               |

Pour le sérum Humain nous avons effectué les mêmes séries d'expériences sur  
deux sérums Humains différents (tableau VI).

TABLEAU VI

Dosage gravimétrique et mesure densitométrique des  
protéines sériques humaines

| Sérum de<br>Lapin | Poids en g de protéines<br>dans 1 ml de sérum | Densité optique |                    |                    |                    |
|-------------------|-----------------------------------------------|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                   |                                               | $\frac{1}{100}$ | $\frac{0,75}{100}$ | $\frac{0,50}{100}$ | $\frac{0,25}{100}$ |
| 1                 | 0,0825                                        | 71              | 53,5               | 36                 | 19                 |
| 2                 | 0,0787                                        | 68,5            | 52                 | 34                 | 18                 |

Les courbes reliant la densité optique à la teneur en protides ont été construites pour  
d'une part le sérum de Lapin, d'autre part, le sérum Humain. Nous avons constaté qu'elles se  
superposaient exactement. Nous avons ainsi établi la courbe donnée par la figure 10.

b) Etude du vieillissement du sérum

Cette étude a été faite dans le but de savoir exactement combien de temps nous pou-  
vions conserver un même sérum sans que celui-ci n'ait subi de modifications importantes.

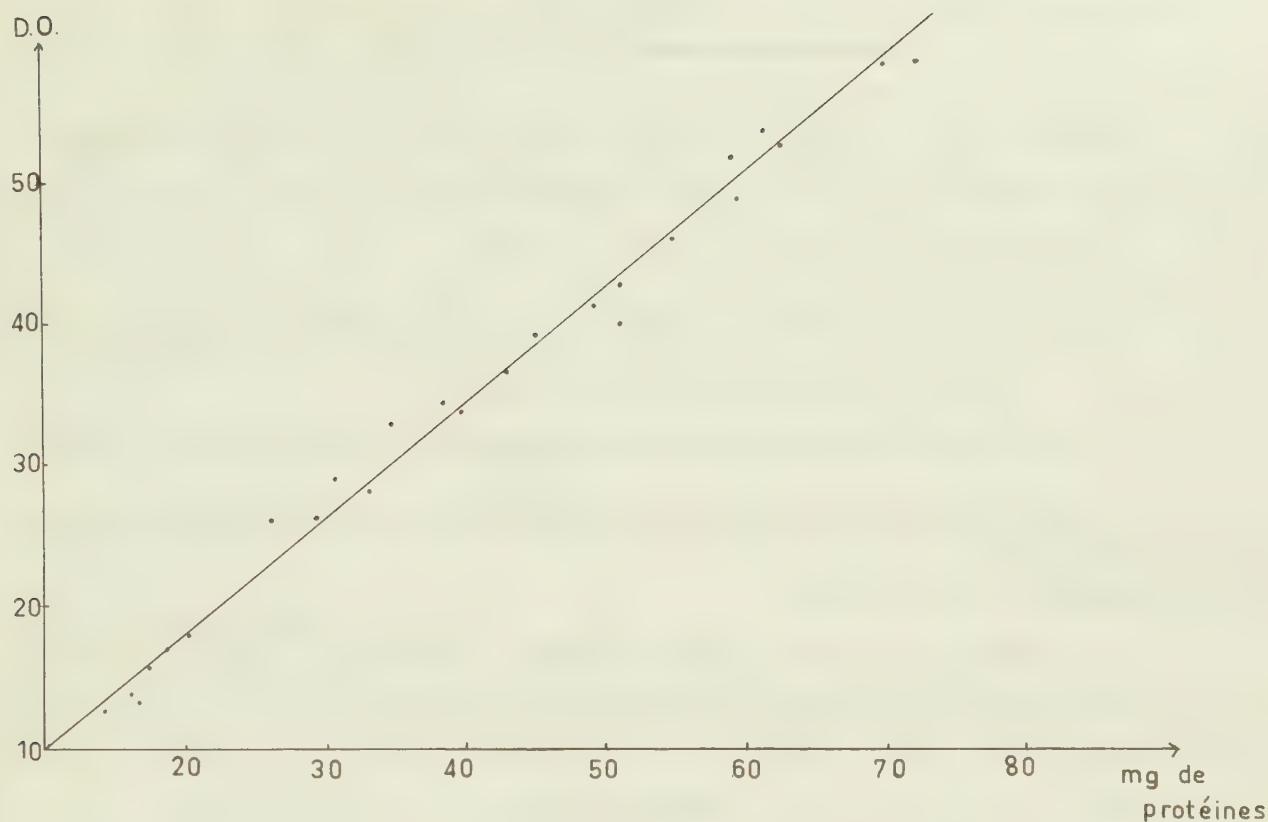


Figure 10 - Courbe reliant la densité optique à la teneur en protides

Dans des fioles jaugées, nous avons préparé deux solutions au  $\frac{1}{100}$  d'un même sérum avec du sérum physiologique.

L'une (A) est conservée à température ambiante.

L'autre (B) est conservée au froid à 4°C.

Tous les jours pendant 9 jours nous avons mesuré la densité optique de ces solutions au spectrophotomètre à 280 mμ.

Nous avons obtenu les résultats suivants (tableau VII).

TABLEAU VII

Etude du vieillissement du sérum de Lapin

| Solution | Temps<br>0 | 1er<br>jour | 2ème<br>jour | 3ème<br>jour | 4ème<br>jour | 7ème<br>jour | 8ème<br>jour | 9ème<br>jour |
|----------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| A        | 0,540      | 0,570       | 0,760        | 0,82         | 0,84         | 0,88         | 0,92         | 0,94         |
| B        | 0,540      | 0,540       | 0,540        | 0,540        | 0,540        | 0,540        | 0,540        | 0,545        |

Pour la solution B, à partir du 7ème jour nous pouvions observer un léger trouble.

Par cette étude nous voyons que nous pouvons utiliser cinq jours de suite le même sérum conservé à 4°C.

3 - Les tampons pour électrophorèse

Le tampon universel type MICHAELIS cité par WUHRMANN et WUNDERLY (1961) a été utilisé à différents pH et différentes forces ioniques. Nous avons réuni dans le tableau VIII les compositions ioniques de chaque tampon de pH 7,4 à pH 9,5 ainsi que leur force ionique.

TABLEAU VIII

Tampons universels de Michaelis de pH 7,4 à pH = 9,5

| pH  | Force Ionique | Acétate de<br>Sodium | Véronal<br>Sodique | Acide<br>Chlorhydrique<br>$\frac{N}{10}$ | Eau<br>Distillée<br>q. s. q. |
|-----|---------------|----------------------|--------------------|------------------------------------------|------------------------------|
| 7,4 | 0,129         | 6,45 g               | 9,8 g              | 340 ml                                   | 1 000 ml                     |
| 8   | 0,114         | 6,45 g               | 9,8 g              | 190 ml                                   | 1 000 ml                     |
| 8,2 | 0,109         | 6,45 g               | 9,8 g              | 140 ml                                   | 1 000 ml                     |
| 8,4 | 0,105         | 6,45 g               | 9,8 g              | 100 ml                                   | 1 000 ml                     |
| 8,6 | 0,1           | 6,45 g               | 9,8 g              | 60 ml                                    | 1 000 ml                     |
| 8,8 | 0,099         | 6,45 g               | 9,8 g              | 50 ml                                    | 1 000 ml                     |
| 9   | 0,098         | 6,45 g               | 9,8 g              | 30 ml                                    | 1 000 ml                     |
| 9,5 | 0,0958        | 6,45 g               | 9,8 g              | 8 ml                                     | 1 000 ml                     |
|     |               |                      |                    |                                          |                              |
| 8,6 | 0,075         | 6,45 g               | 3,4 g              | 40 ml                                    | 1 000 ml                     |

Pour exprimer la force ionique, nous avons choisi le symbole  $\frac{\Gamma}{2}$ , recommandé par BULL (1964) afin de ne pas le confondre avec d'autres symboles.

- Le tampon véronal, véronal sodique : pH = 8,6  $\frac{\Gamma}{2} = 0,075$

|                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| - véronal sodique | 15,40 g           |
| - véronal         | 2,76 g            |
| - eau distillée   | q. s. q. 1 000 ml |

- Le tampon ARONSSON et GRONWALL (1957) : pH = 8,9  $\frac{\Gamma}{2} = 0,08$

|                                       |                   |
|---------------------------------------|-------------------|
| - tris(hydroxy méthyl)amino méthane   | 60,5 g            |
| - acide éthylène-diamine tétracétique | 6 g               |
| - acide borique                       | 4,6 g             |
| - eau distillée                       | q. s. q. 1 000 ml |

#### - Appareillage

L'appareil est constitué par un bloc de forme parallélépipédique non conducteur, partagé en son milieu en deux compartiments égaux contenant chacun une électrode.

Les extrémités des bandes d'électrophorèse placées sur un support, plongent dans chacun des compartiments remplis également de tampon et fermés par un couvercle.

Les électrodes sont reliées à un dispositif redresseur et stabilisateur de courant. Un potentiomètre permet de maintenir la tension constante.

#### A/ Electrophorèse sur acétate de cellulose gélatineux

##### A.1 - Acétate de cellulose gélatineux humide

déposé sous le nom de Cellogel par les Laboratoires SPETEC (+).

L'acétate de cellulose gélatineux humide est conservé dans un mélange de méthanol et d'eau à parties égales. Il ne peut être conservé à l'état sec sans un traitement particulier.

##### A.1.1 - Appareillage

Pour l'acétate de cellulose gélatineux humide, nous avons utilisé une cuve à électrophorèse type KOHN dont chaque bac est rempli de 130 ml de tampon de façon que le bord inférieur du support affleure la surface du tampon.

---

(+) Diffusés par les Laboratoires SEBIA, Paris - France.

## A.1.2 - Conduite de l'électrophorèse

Les bandes de cellogel de 2,5 cm de large et 17 cm de long, doivent être préparées par un lavage de 10 à 15 minutes dans la solution tampon utilisée. Il est essentiel que la bande flotte d'abord à la surface du tampon et soit immergée seulement après, afin d'éviter que des bulles d'air soient retenues dans les pores de la bande retardant l'imprégnation (WILLIAMS, 1968). Les bandes de cellogel imprégnées de solution tampon sont essorées entre deux feuilles de papier filtre. Il ne doit y avoir ni un excès d'humidité, ni des tâches blanches opaques indiquant des zones sèches. Sur les bandes soigneusement essorées, nous marquons à 5 cm d'une des extrémités à l'aide d'un stylo à bille noir l'emplacement des dépôts de sérum, puis nous tendons les bandes horizontalement sur le support, leur face mate vers l'extérieur.

Le support est placé dans l'appareil. On établit le courant de façon que l'ampérage indique une valeur d'environ 2,5 milliampères par bande. Pendant 20 minutes nous laissons le courant passer pour que dans les bandes se fasse l'équilibre des mouvements liquidiens, lesquels risqueraient de perturber ultérieurement la migration électrophorétique des protéines. Nous déposons à l'emplacement prévu à cet effet à l'extrémité cathodique des bandes 1  $\mu$ l d'échantillon à l'aide d'une micro-pipette, sur une distance d'environ 1,5 cm. Nous laissons migrer le temps voulu. Compte tenu du fait que la mobilité électrophorétique augmente quand l'intensité du courant augmente et que la force ionique du tampon diminue pour obtenir des électrophorégrammes identiques quel que soit le tampon utilisé, nous avons dû pour chacun des tampons établir un voltage et un temps de migration défini. Tableau IX.

TABLEAU IX

Voltage et temps de migration pour les différents tampons

| Tampons                           |          |                       | Voltage | Temps     |
|-----------------------------------|----------|-----------------------|---------|-----------|
| Tampon Michealis                  | pH = 8,6 | $\frac{r}{2} = 0,1$   | 120 V   | 2 h 15 mn |
|                                   | pH = 8,6 | $\frac{r}{2} = 0,075$ | 140 V   | 2 h 15 mn |
|                                   | pH = 7,4 | $\frac{r}{2} = 0,129$ | 110 V   | 2 h 15 mn |
| Tampon véronal<br>véronal sodique | pH = 8,6 | $\frac{r}{2} = 0,075$ | 140 V   | 2 h 15 mn |
| Tampon ARONSSON<br>et GRONWALL    | pH = 8,9 | $\frac{r}{2} = 0,08$  | 130 V   | 2 h 15 mn |

Pour les tampons-type Michaelis de pH = 9,5 et 8,8, nous avons pu garder 120 Volts pendant 2 h 15 mn, la différence entre les forces ioniques étant très faible.

D'après WUHRMANN (1961) le système tampon et la force ionique doivent être adaptés à chaque mélange de protéines. Pour les sérums Humains et de Lapin nous n'avons pas observé de différences, les séparations des protéines nous ont paru aussi optimales dans l'un comme dans l'autre cas indépendamment du tampon utilisé. Les différentes fractions protéiques se trouvaient toujours dans le même ordre.

#### A.1.3 - Coloration des électrophorégrammes

Après la migration électrophorétique, les bandes d'acétate de cellulose humides sont essorées pour enlever l'excès de solution tampon puis immergées pendant 2 minutes dans le bain suivant :

Noir-Amido : 0,5 g ; alcool méthylique : 40 ml ; eau distillée : 50 ml ; acide acétique : 10 ml ; qui fixe et colore les protéines.

L'excès de colorant est éliminé par des lavages successifs jusqu'à décoloration complète du support à l'aide du mélange suivant :

Alcool méthylique : 35 ml ; eau distillée : 50 ml ; acide acétique : 7 ml ; diacétone alcool : 10 ml.

Ce mélange présente l'intérêt de "diaphaniser" en même temps les bandes par la présence du diacétone alcool.

Les électrophorégrammes humides sont étroitement appliqués sur des plaques de verre dégraissées, puis ils sont séchés à l'étuve à 100° pendant 5 minutes. Le diacétone alcool permet à cette température d'obtenir un cellogel rigide et translucide.

Après refroidissement, on peut décoller les bandes de leur support de verre et les conserver sèches.

#### A.1.4 - Préparation des autoradiogrammes

Les électrophorégrammes sont appliqués à l'obscurité sur un film radiographique KODIREX monocouche et maintenus en contact pendant une certaine durée dépendant de l'activité volumique du composé organo-mercuriel et de l'énergie du rayonnement émis par le radionucléide.

- Un dépôt de  $10^{-6}$  mCi de  $^{203}\text{Hg}$  demande 3 jours de contact.
- Un dépôt de  $10^{-6}$  mCi de  $^{197}\text{Hg}$  demande 5 jours de contact.

Les films exposés sont révélés 2 minutes dans le révélateur L. X. 24 KODAK, rincés soigneusement à l'eau courante et enfin séchés 30 minutes dans une enceinte chauffée ventilée, suivant la technique de ROUSSELET (1966).

#### A.1.5 - Mesure de la densité optique de l'électrophorégramme et de son autoradiogramme

La répartition des fractions protéiques et la distribution de la radioactivité le long des bandes sont estimées par enregistrement automatique de la densité optique à l'aide d'un densitomètre (Titromatic Quéré équipé d'un photomètre à électrophorèse et d'un planimètre intégrateur). La densité optique le long de la bande, qui ne doit pas dépasser 0,8 pour qu'il y ait proportionnalité, est enregistrée automatiquement par un stylet inscripteur sur une feuille de papier millimétré. La valeur de la densité optique est inscrite en ordonnée, le déplacement de la bande exprimé en millimètres est inscrit en abscisse.

Les enregistrements de l'autoradiogramme et de l'électrophorégramme sont exactement superposés en s'aidant d'un repère radioactif que l'on trace sur la bande d'acétate de cellulose avant de mettre le film en contact. L'enregistrement du planimètre intégrateur permet de connaître, par rapport à la surface totale, le pourcentage de chaque fraction protéique et de chaque fraction radioactive.

#### A.2 - Acétate de cellulose gélatineux sec

Cette méthode est identique dans son principe à la précédente ; elle consiste à employer l'acétate de cellulose gélatineux sec qui présente l'intérêt d'autoriser la mise en contact immédiate de la bande portant l'électrophorégramme, avec le film radio sans qu'elle subisse de traitement particulier après la migration électrophorétique. Ceci nous permet d'éviter la perte de radioactivité des protéines au cours de leur coloration.

##### A.2.1 - Appareillage et technique d'électrophorèse

Nous avons utilisé la même cuve à électrophorèse et suivi strictement la même technique que pour l'acétate de cellulose humide. Pour chacun des tampons, le voltage et le temps de migration ont été conservés. Les électrophorégrammes obtenus sur acétate de cellulose sec étaient identiques à ceux obtenus sur cellogel.

Après la migration électrophorétique nous pouvons soit sécher les bandes à l'air ambiant pendant une demi-heure et les mettre en contact directement avec le film radio KODIREX monocouche, soit colorer les protéines et diaphaniser les bandes.

### A. 2. 2 - Coloration des électrophorégrammes

Les bandes d'acétate de cellulose sec sont plongées pendant 5 à 6 minutes dans le mélange suivant :

Ponceau S : 0, 2 g ; Acide trichloracétique 3 g ; eau distillée 100 ml.

Le colorant non fixé sur les protéines est éliminé par des rinçages successifs dans des bains d'acide acétique à 5 % jusqu'à décoloration totale du support. Pour diaphaniser les bandes, on éponge l'excès d'acide acétique et on place celles-ci dans un bain d'éthanol à 95 % : Dans un bac contenant la solution de diaphanisation (Cyclohexanone : 33 volumes ; éthanol à 95 % : 67 volumes), on dépose une plaque de verre, puis par dessus complètement immergée une bande d'acétate de cellulose. On retire ensemble du bac la plaque de verre et la bande que l'on a soin de bien superposer l'une sur l'autre. Les bandes sont séchées à l'air libre pendant 1 heure ou pendant 5 minutes à 100°. Après refroidissement on peut les décoller de leur support de verre.

Cette technique de coloration des protéines présente l'intérêt d'être très rapide mais donne de moins bons résultats que la coloration au noir-Amido. La séparation des protéines paraît moins nette.

### A. 2. 3 - Préparation des autoradiographies

La préparation des autoradiographies se fait en suivant strictement le protocole utilisé pour le cello-gel.

### A. 2. 4 - Mesure des densités optiques de l'électrophorégramme et de son autoradiographie

L'enregistrement des densités optiques a été effectué à l'aide du Titromatic-Quéré.

### B/ Electrophorèse sur papier

Cette méthode identique dans son principe aux deux précédentes consiste à employer un autre support : le papier. Celui-ci présente pour nous l'intérêt d'être de constitution différente de l'acétate de cellulose et de pouvoir être mis en contact avec le film radio immédiatement après la migration électrophorétique. Il a, en revanche, l'inconvénient de donner une moins bonne séparation des protéines que l'acétate de cellulose. L'absorption au cours de l'électrophorèse par le papier n'est pas négligeable, de telle sorte que chaque fraction protéique est suivie d'une queue qui peut interférer avec les taches suivantes (WUNDERLEY, 1961) :

### B. 1 - Appareillage

L'appareil utilisé est une cuve à électrophorèse type KOHN, de dimensions supérieures à celle utilisée pour l'acétate de cellulose. Chaque bac est rempli de 200 ml du tampon choisi.

### B. 2 - Conduite de l'électrophorèse

Les bandes d'électrophorèse en papier WHATMAN n° 1, de 18 cm de long et 3 cm de large sont imprégnées du tampon utilisé, soigneusement essorées et tendues sur le support. Avant de placer le support dans la cuve à électrophorèse on dépose à l'extrémité cathodique des bandes encore humides, 5 µl de sérum à l'aide d'une micro-pipette sur une longueur de 2 cm.

Les dépôts de sérum faits, on place le support dans la cuve à électrophorèse et l'on recouvre l'appareil d'un couvercle.

Le courant est établi : 165 Volts pour le tampon Michaelis de pH = 8,6 et  $\frac{\Gamma}{2} = 0,1$  ; 180 Volts pour le tampon véronal, véronal sodique de pH = 8,6 et  $\frac{\Gamma}{2} = 0,075$  . On laisse migrer pendant cinq heures et demi.

Après la migration électrophorétique, on peut soit sécher les bandes à l'étuve à 100° pendant 5 minutes et préparer ensuite directement les autoradiographies, soit colorer immédiatement les protéines.

### B. 3 - Coloration des protéinogrammes

Les bandes de papier sont immergées pendant 15 minutes dans une solution méthanolique saturée de noir-Amido. Le colorant non fixé sur les protéines est éliminé par lavages successifs jusqu'à coloration complète du support dans le bain suivant :

Méthanol : 100 ml ; acide acétique : 30 ml ; eau distillée : 70 ml.

### B. 4 - Mesure de la densité optique de l'électrophorégramme et de son autoradiographie

Les bandes portant les électrophorégrammes sont rendues translucides par immersion 4 à 6 heures dans un mélange de vaseline et de bromonaphtalène (4 : 1). Insérées entre deux lames de verre, on peut les placer sous le densitomètre Titromatic Quéré.

## JUSTIFICATION DE LA METHODE

### 1) Electrophorèse sur cellogel

a) Cette méthode simple et reproductible présente l'intérêt de donner une très bonne séparation des principales fractions protéiques, albumine,  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  globulines, quel que soit le tampon utilisé. Cette technique cependant accuse pour nous l'inconvénient de ne pouvoir mettre en contact, immédiatement après la migration électrophorétique, la bande d'électrophorèse et le film radio. Le cellogel en effet doit subir un traitement pour être conservé sec. Au cours de ce traitement, nous avons constaté que nous perdions jusqu'à 30 % du composé mercuriel fixé aux protéines.

b) Ne connaissant pas la nature et la force de la liaison protéine - organo mercuriel et afin d'éviter autant que possible sa détérioration nous avons conduit nos fractionnement avec une force ionique maximale de 0,1 et un ampérage de 2,5 mA par bande aussi faible que possible, compatibles avec une bonne séparation des fractions protéiques.

c) Nous avons employé simultanément trois tampons différents : le tampon Tris (ARONSSON et GRONWALL, 1957), le tampon type MICHAELIS et le tampon Véronal-Véronal sodique. Ces trois tampons donnent des séparations protéiques satisfaisantes qui nous permettent d'étudier leur influence éventuelle sur la liaison protéine - organo mercuriel.

d) Nous avons vu que la densité optique des bandes lues au densitomètre ne devait pas excéder la valeur de 0,8 pour être assurée de la proportionnalité entre doses et densité optique. Nous avons alors étalonné l'appareil utilisé. La figure 11 montre que les résultats ne sont pas exempts d'une erreur systématique même à une densité optique inférieure à 0,8. La précision obtenue cependant nous paraît suffisante pour les études comparatives.

### 2) Electrophorèse sur acétate de cellulose sec

a) Cette méthode d'électrophorèse offre l'avantage de pouvoir mettre en contact la bande d'acétate de cellulose et le film radio immédiatement après le fractionnement électrophorétique des protéines.

b) Cependant cette technique ne nous donne pas une séparation des différentes fractions protéiques aussi bonne que le cellogel.

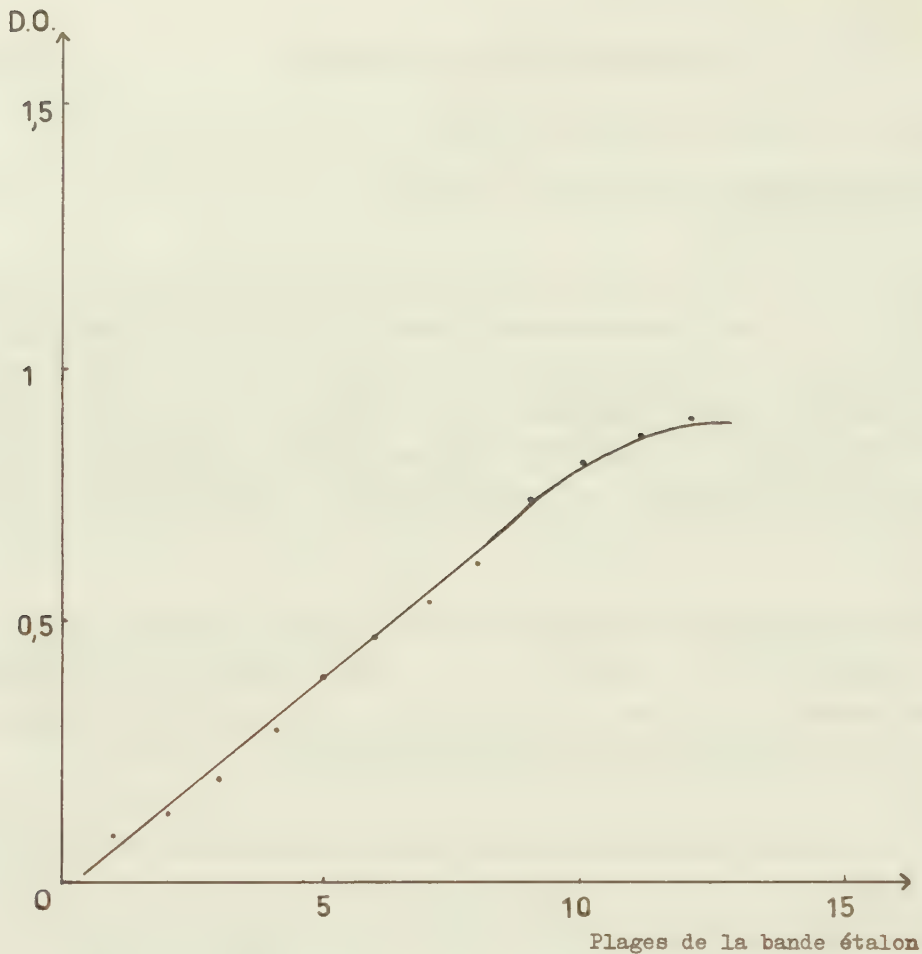


Figure 11 - Etalonnage du Titromatic Quéré pour lecture des densités optiques à l'aide d'une bande étalonnée.

N. B. Dans les tableaux, les densités optiques supérieures à 0,5 sont représentées par ++  
les densités optiques inférieures à 0,5 sont représentées par +

### 3) Electrophorèse sur papier

La technique d'électrophorèse sur papier nous a permis d'utiliser un support différent de l'acétate de cellulose.

Elle présente l'inconvénient d'être beaucoup plus longue que les deux techniques précédentes et de donner une séparation des fractions protéiques beaucoup moins nette.

Si la méthode électrophorétique autorise une séparation des fractions protéiques, elle modifie la liaison des organo-mercuriels aux protéines. Dans le but de pallier en partie cet inconvénient, nous avons fait appel à une autre technique mettant en oeuvre un autre support.

### 3 - Séparation par filtration sur gel des protéines sériques

Nous avons fait appel à la filtration en colonne, sur gel de dextrane (Séphadex) dans le but de mettre en évidence une interaction éventuelle entre les protéines et les composés organo-mercuriels sans détériorer la liaison.

#### - Principe

La filtration sur gel est une méthode chromatographique qui permet la séparation des molécules d'après leurs dimensions respectives. Les gels de Séphadex en effet sont constitués de petites perles (polysaccharides) réticulées sous forme d'un réseau à trois dimensions plus ou moins fin et dont les pores se comportent comme un tamis séparant les molécules en fonction de leur taille (figure 12, d'après O. MIKES, 1966).

Les molécules de dimensions supérieures aux plus gros pores du Séphadex gonflé, c'est-à-dire au-dessus de la limite d'exclusion, ne peuvent pénétrer dans les grains du gel ; elles traversent le gel dans sa phase liquide circulante autour des grains et quittent la colonne les premières (PORATH, 1963). Les molécules plus petites diffusent plus ou moins dans le gel, suivant la taille et leur forme (figure 13).

#### - Appareillage

L'appareil <sup>(+)</sup> (figure 14) est constitué par :

- 1) une colonne en verre de 1 mètre de long et 2,5 cm de diamètre, fermée à ses deux extrémités par des adaptateurs permettant d'obtenir une élution ascendante. Cette colonne est remplie de Séphadex qui permet d'effectuer la séparation des protéines ;
- 2) un réservoir de 500 ml destiné à contenir l'éluant et un réservoir de 10 ml destiné à recevoir le sérum, tous deux équipés en vase de Mariotte et reliés à l'ajustage inférieur de la colonne par un tube de polythène de même diamètre que celui de la sortie de la colonne et branché sur un robinet à trois voies ;
- 3) un collecteur de fraction permet de recueillir l'éluat dans des tubes à hémolyse, en quantité volumique déterminée à l'aide d'un compteur de gouttes ;
- 4) une pompe péristaltique permet de régler la pression dans la colonne et par cela la vitesse d'écoulement de l'éluant.

---

(+) Diffusé par les Laboratoires JARRE-JACQUIN - 18, rue Pierre Curie, Paris V°.

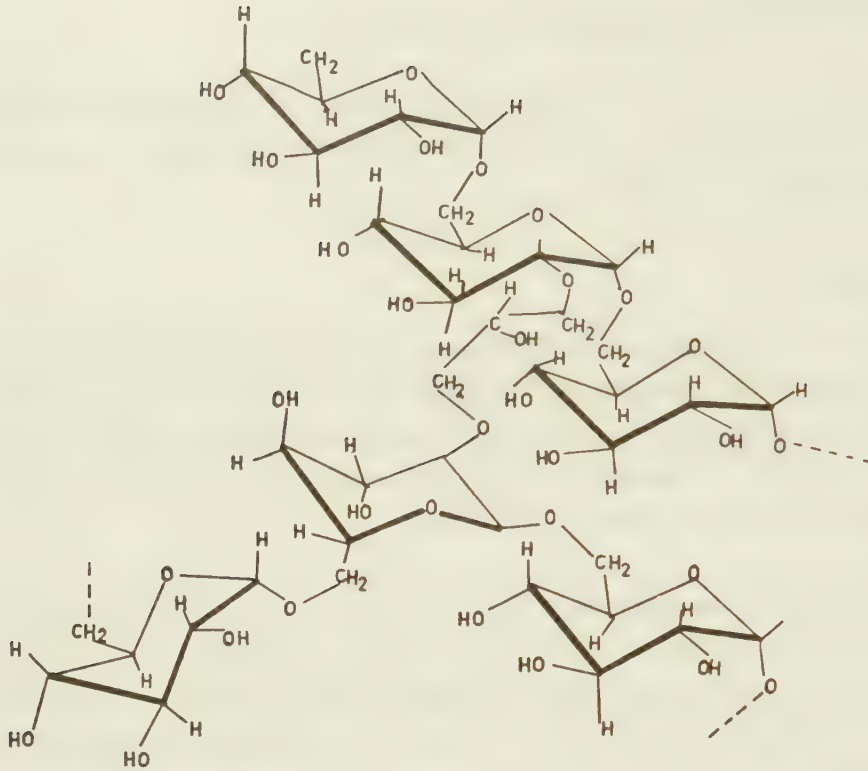


Figure 12 - Structure du Séphadex G. 200

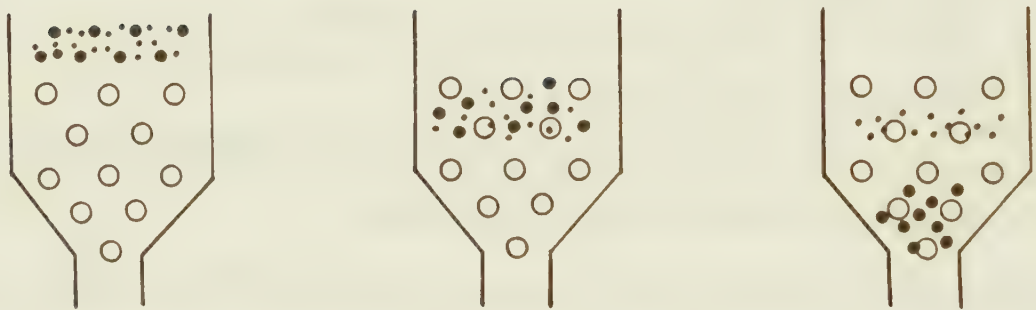


Figure 13 - Passage de molécules de différentes tailles à travers le gel

- représente les molécules du gel
- représente les grosses molécules
- représente les petites molécules

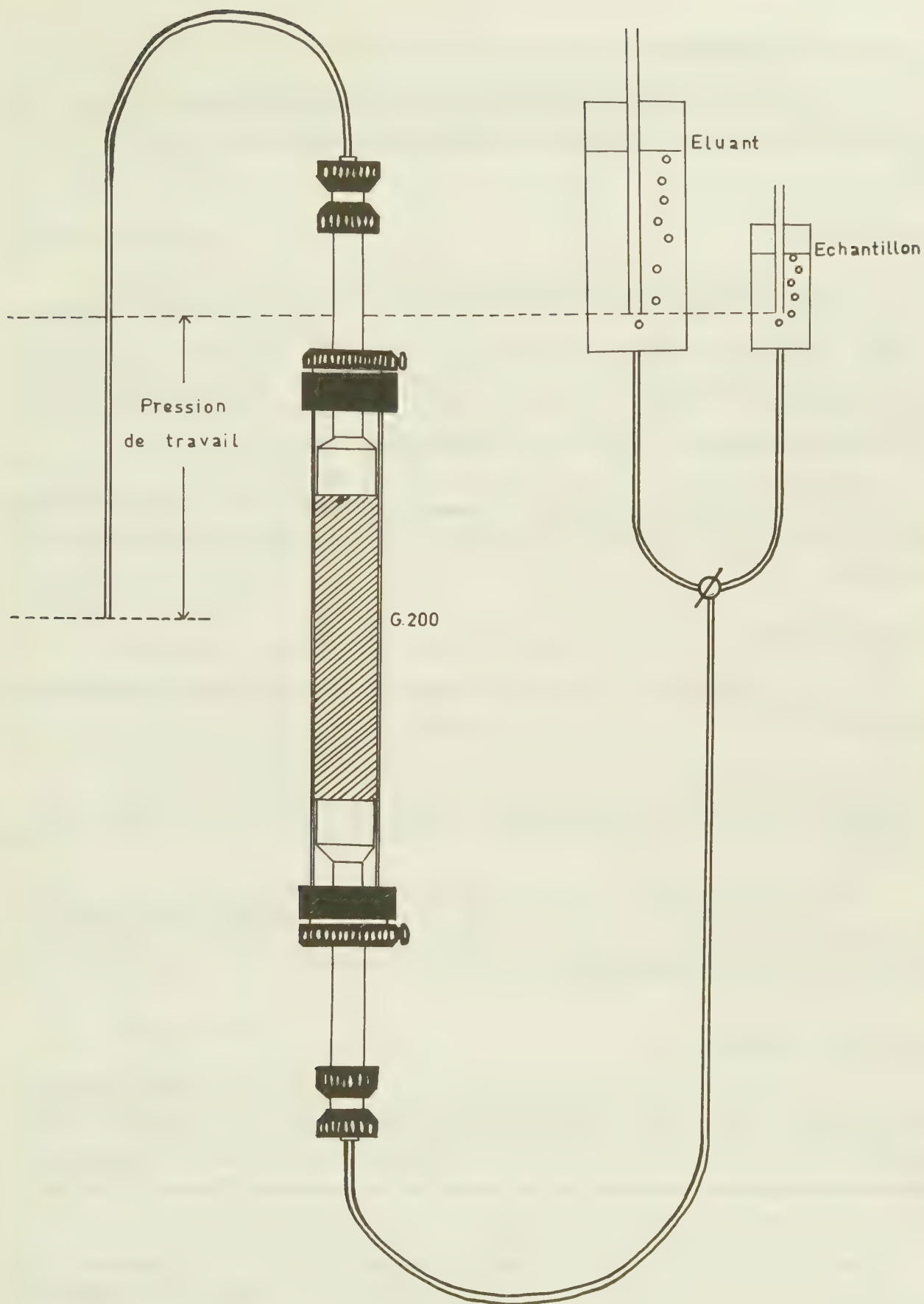


Figure 14 - Appareil à chromatographie sur colonne de Séphadex G.200

- Mise au point de la méthode

Nous avons cherché les conditions les plus favorables à une séparation des protéines sériques. Nous nous sommes préoccupés du choix de l'éluant, du gel et de la quantité d'échantillon.

a) Choix du gel

Les gels de dextrane sont définis par leur degré de réticulation (G. 25, G. 100, G. 200, etc...) qui est une fonction inverse de leur porosité. Celle-ci conditionne leur capacité de filtrer une molécule de poids moléculaire de plus en plus élevé. Par exemple le G. 25 retient des molécules de poids moléculaire inférieur à 5 000, tandis que les molécules plus lourdes ne seront pas retenues. Le G. 200 par contre pourra assurer la rétention provisoire de molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 800 000 (SMITHIES, 1962).

Nous avons choisi le gel G. 200 qui permet les meilleures séparations des protéines sériques puisqu'il permet de séparer les molécules de poids moléculaires compris entre 5 000 et 800 000.

b) Choix de l'éluant

Afin de diminuer les interactions protéines-protéines, nous avons utilisé suivant la méthode de FLODIN et KILLANDER (1962) des tampons de force ionique  $\frac{\Gamma}{2} = 0,1$  :

- le tampon universel type Michaelis de pH = 8,6 , déjà cité pour les électrophorèses,
- le tampon recommandé par FLODIN de pH = 8 : tris(hydroxy-méthyl)amino-méthane 0,1 M ; NaCl 0,2 M ; HCl q. s. q. pH = 8.

Le Séphadex comporte un petit nombre de groupes carboxyles qui provoquent une légère absorption de cations et une légère exclusion d'anions. Nous avons donc intérêt à utiliser un éluant de force ionique assez grande.

c) Taille de l'échantillon

Nous avons cherché à obtenir une séparation des protéines aussi poussée que possible. Pour cela la zone initiale d'échantillon introduit dans la colonne doit être aussi étroite que possible. On l'obtient en limitant la quantité d'échantillons au volume minimum qui donne une répartition homogène à la surface du gel. Si l'opération d'introduction de l'échantillon est effectuée avec soin, ce volume peut être très faible.

Il a été montré que le volume d'échantillon devait être voisin de 2 % du volume total du gel. Si le volume de l'échantillon est inférieur, nous aurons une mauvaise séparation car

il se produit un phénomène de diffusion de l'échantillon dans le gel. Si le volume de l'échantillon est supérieur, nous obtenons une séparation avec chevauchement des fractions (figure 15). En fait, la taille de l'échantillon doit être inférieure au volume de séparation. On peut prendre un échantillon aussi grand que possible dans les limites fixées par les impératifs de la séparation elle-même (figure 16).

#### d) Dosage des protéines

Pour le dosage des protéines, nous avons choisi la méthode spectrophotométrique à 280 mμ.

##### Technique

Le fractionnement de l'éluant se faisant à raison de 1,6 ml soit 32 gouttes. Pour obtenir une quantité suffisante de liquide pour la mesure au spectrophotomètre, nous diluons chaque fraction dans 3 ml de sérum physiologique. La concentration en protéines nous est donnée par la lecture densitométrique.

#### e) Dosage de la radioactivité

La quantité de mercure radioactif dans chaque tube est appréciée par mesure de la radioactivité dans un scintillateur à cristal creux.

##### - Expression des résultats

Sur papier millimétré nous traçons deux courbes ayant toutes deux pour abscisse le volume d'élution, représenté par les numéros croissants tubes.

- Une des courbes aura pour ordonnées les densités optiques des concentrations en protéines de chaque tube à hémolyse.
- L'autre courbe aura pour ordonnées les radioactivités de ces mêmes tubes.

##### - Mode opératoire

#### a) Préparation du gel

Le gel sec se présente sous l'aspect d'une poudre granuleuse très fine, glissante entre les doigts.

Pour obtenir un débit correct et une bonne séparation des protéines, le gel doit être très soigneusement préparé. Il est nécessaire de le mettre à gonfler dans un excès de tampon choisi comme éluant et de le laisser reposer pendant 3 jours à température ambiante, ou 5 heures dans un bain-marie d'eau bouillante.

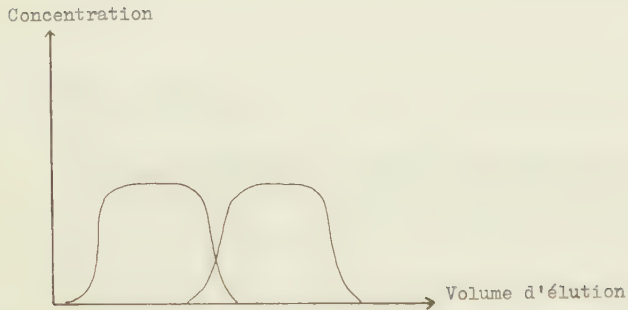


Figure 15 - Le volume de l'échantillon est supérieur au volume de séparation. Il y a chevauchement des fractions à séparer.

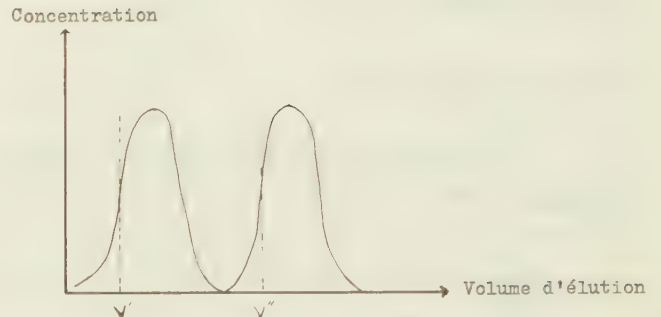


Figure 16 - Le volume de l'échantillon est maximum pour que la séparation soit complète dans les conditions de l'expérience.  
 $V'' - V' = \text{Volume de séparation}$

L'éluant utilisé pour la préparation du gel doit contenir quelques gouttes d'une solution d'azoture de sodium à 0,02 % ou 3 gouttes de formol officinal afin d'éviter l'apparition de bactéries et de moisissures qui altèrent les propriétés chromatographiques du Séphadex ainsi que le débit à travers la colonne.

Il faut avoir soin de ne pas emprisonner de bulles d'air dans le mélange de gel et de liquide car celles-ci provoqueraient un débit irrégulier. On évite cet inconvénient en effectuant le gonflement au bain-marie bouillant.

#### b) Remplissage de la colonne

Le remplissage de la colonne est très important car on ne peut obtenir un débit constant et une diffusion minimum qu'en travaillant avec une colonne parfaitement remplie (JANSON, 1967).

Pour obtenir un remplissage homogène, il faut charger la totalité du gel en suspension en une seule fois, de façon à éviter la formation de zone sur la colonne. Dans ce but, nous utilisons un réservoir de gel que nous vissons au sommet de la colonne et qui contiendra l'excès de gel en suspension. Pour 20 g de gel sec, mis à gonfler dans un litre d'éluant, il faut remplir le réservoir de 300 ml de gel gonflé afin que la colonne de Séphadex ait une hauteur de 90 cm à la pression de gel désirés. Pour éviter l'obturation des filtres tamis des adaptateurs, il faut à chaque extrémités de la colonne intercaler entre les adaptateurs et le G. 200 quelques cm<sup>3</sup> de G. 50.

Après avoir placé la colonne verticalement, la sortie inférieure de la colonne étant fermée, nous la remplissons au tiers d'éluant avant de verser la solution de gel. Cette solution doit être très soigneusement versée en évitant toute formation de bulles. Quand le réservoir qui surmonte la colonne contient 300 ml de la solution de gel, on ouvre alors la sortie inférieure de la colonne. Il faut surveiller que le gel soit toujours recouvert d'éluant pour éviter un possible dessèchement. On attend que le niveau supérieur du gel atteigne 5 cm au-dessous du bord supérieur de la colonne de verre pour arrêter l'écoulement et remplacer le réservoir prolongeant la colonne par un bouchon adaptateur identique à celui déjà placé à la sortie inférieure. On met alors en route la circulation ascendante de l'éluant à travers le gel. Le lit du gel est lavé par l'éluant toute une nuit afin de le stabiliser, la vitesse d'écoulement étant réglée pour 10 ml à l'heure par une pompe péristaltique.

#### c) Dépôt de l'échantillon

Il faut pour éviter toute perturbation dans la colonne que l'échantillon soit introduit à la même vitesse que celle d'écoulement de l'éluat. La pression de travail ne doit pas changer (GELOTTE, 1962).

A l'aide d'un robinet à 3 voies nous coupons l'arrivée de l'éluant pour laisser l'échantillon s'écouler. Les niveaux inférieurs d'entrée d'air des deux vases de Mariotte contenant l'un l'éluant, l'autre l'échantillon, doivent être à la même hauteur par rapport à la sortie de l'éluat. C'est ce que l'on appelle la pression de travail (figure 14).

Avant de remettre la circulation d'éluant, il faut veiller à l'absence d'entrée d'air dans le tube en aval du robinet. Pour éviter ce phénomène, on ne vide pas intégralement le réservoir d'échantillon.

L'éluant est recueilli dans des tubes à hémolyse à l'aide d'un collecteur de fraction à raison de 32 gouttes par tube. Pour chacun des tubes, nous comptons la radioactivité et mesurons l'absorption spectrophotométrique à 280 mμ, pour construire les courbes qui nous permettront de repérer sur quel groupe de protéines se fixe le composé organo-mercuriel.

#### 4 - La radio-immuno-électrophorèse

Dans le but de déterminer avec le plus de précision possible sur quelles protéines les composés organo-mercuriels se fixaient, nous avons choisi la méthode de radio-immuno-électrophorèse.

Cette méthode d'analyse est remarquable par sa spécificité. Chaque type de protéines a des propriétés antigéniques et physico-chimiques différentes permettant ainsi au mélange de protéines que contient le sérum d'être séparé en ses différents constituants par l'immunoélectrophorèse. Comme les différences électrophorétiques et antigéniques sont mesurées sur un même système de gel de gélose, cette technique est considérée comme la méthode la plus sensible d'identification simultanée des protéines sériques. Elle est remarquable aussi par sa sensibilité puisqu'il suffit de quelques g d'échantillon pour isoler une trentaine de protéines.

##### - Principe

Mise au point par GRABAR et WILLIAMS (1955), cette technique d'immuno diffusion spécifique combine la séparation des antigènes par électrophorèse sur gel de gélose et leur mise en évidence par des réactions antigène-anticorps, qui aboutit à la formation d'arcs de précipitation visibles (figure 17). Le sérum est introduit dans un réservoir creusé dans le gel de gélose. Les protéines sériques sont ensuite séparées en fonction de leurs différences de mobilité dans un courant électrique appliqué au support gélose-tampon. Après la migration électrophorétique des protéines, on introduit l'anti-sérum dans une gouttière creusée dans le gel de gélose suivant le grand axe de la plaque. Les plaques sont ensuite mises à incuber ; pendant ce temps, le sérum et l'anti-sérum diffusant l'un vers l'autre. Si les proportions antigènes-anticorps spécifiques sont correctes, il se forme des complexes, apparaissant comme des arcs de précipitation spécifiques, plus ou moins ellipsoïdaux.

##### - Les réactifs

###### a) Le gel de gélose

Le gel d'agar employé pour l'immuno-électrophorèse doit avoir subi une purification suffisamment poussée pour permettre de bons résultats. Le gel doit contenir le moins possible de calcium, avoir un aspect transparent et posséder un bas point de solidification. Dans la gélose non lavée, la migration électrophorétique des protéines vers l'anode est très affaiblie, la plus grande partie de celles-ci se déplacent en sens inverse par suite du flux électro-osmotique accru.

Nous avons utilisé un produit spécialement préparé par la maison BEHRINGWERKE pour immuno-électrophorèse sous la dénomination "d'Agar pur".

b) Solutions tampons

Nous avons utilisé deux tampons :

- Tampon universel de Michaelis ayant un pH de 8,6 et une force ionique de 0,1 , déjà cité pour les électrophorèses.
- Un tampon de force ionique 0,077 et de pH 8,2 de composition suivante : Véronal sodique : 11,8 g ; acide chlorhydrique normal : 20 ml ; eau distillée q.s.q. 1 000 ml.

c) Les antigènes

Les antigènes sont constituées par les protéines de sérum Humain et de Lapin déjà mentionnés pour les électrophorèses.

d) Les anticorps

Les anticorps sont constitués :

- pour le sérum Humain par les anti-protéines plasmatiques humaines préparées sur Lapin,
- pour le sérum de Lapin par des anti-protéines plasmatiques de Lapin préparées sur Chèvre.

e) Les composés organo-mercuriels

Les antigènes ont été marqués par le MHP et la chlormérodine.

- L'appareillage

L'appareil utilisé pour l'immuno-électrophorèse est conçu suivant le même principe que celui employé pour l'électrophorèse sur papier. Les lames chargées d'antigène sont disposées horizontalement sur les bords des deux bacs de la cuve à électrophorèse remplis également de tampon. Le contact avec le tampon se fait par l'intermédiaire de bandelettes de papier filtre humectées, reposant bien sur la couche d'Agar aux extrémités des lames.

- Technique

1) Séparation électrophorétique sur gélose

a) Préparation de la gélose

A 2 g d'Agar pur nous ajoutons 50 ml de la solution tampon choisie, 50 ml d'eau distillée et 10 mg de thiocide pour permettre la conservation du mélange. Celui-ci est porté dans un bain-marie bouillant jusqu'à ce que nous obtenions une solution parfaitement homogène exempte de toute bulle.

## b) Préparation des plaques

Les lames porte-objet, soigneusement lavées et dégraissées à l'éther, sont disposées sur une table à niveau parfaitement horizontal. Sur chaque lame nous répartissons, à l'aide d'une pipette préalablement chauffée, 3 ml de la solution de gélose tamponnée. La viscosité et la tension superficielle du mélange provoquent et maintiennent une répartition homogène du gel à la surface de la lame. Nous laissons quelques minutes le gel se refroidir complètement.

A l'aide d'un emporte-pièce conçu spécialement à cet effet, nous creusons dans la gélose suivant la figure 18 deux réservoirs destinés à recevoir le sérum que l'on désire étudier. En même temps entre ces deux réservoirs on trace l'emplacement de la future gouttière qui devra recevoir l'immun-sérum.

La distance entre le réservoir de l'antigène et le réservoir de l'anticorps est très important, les arcs de précipitation spécifique ne se forment que lorsque antigène et anticorps se rencontrent dans des proportions convenables. L'emplacement des réservoirs des antigènes dans la plaque de gélose dépend étroitement de la qualité de la gélose. D'après ROUSSELET (1967)

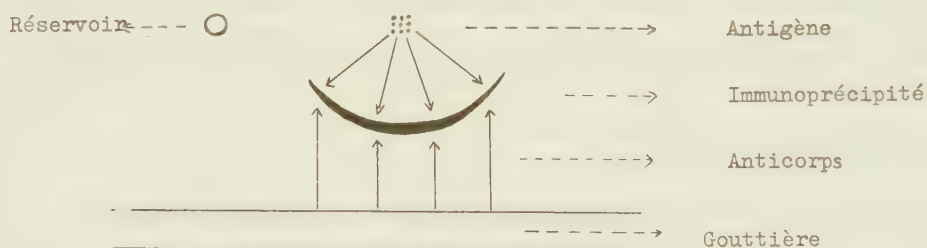


Figure 17 - Formation de l'arc de précipitation

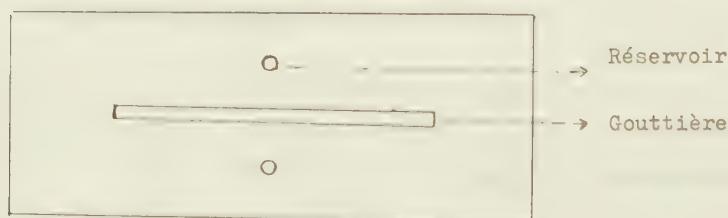


Figure 18 - Plaque de gélose préparée en vue d'une immuno-électrophorèse

- longueur de la gouttière 3,7 cm
- largeur de la gouttière 0,2 cm
- distance de la gouttière aux réservoirs 0,4 cm
- diamètre des réservoirs 0,15 cm

le courant d'électro endosmose dû au mouvement du liquide tampon dans le support est, dans le milieu de la plaque de gélose, assez intense et orienté en sens inverse du déplacement des protéines. Avec la gélose que nous avons utilisée, en situant le point de départ de migration vers le milieu de la plaque, les  $\gamma$  globulines migrent vers la cathode, les  $\beta$  globulines paraissent immobiles, les  $\alpha$  globulines et l'albumine dont la vitesse de migration est notablement supérieure à celle du milieu liquide se déplacent vers l'anode.

Les réservoirs formés reçoivent chacun à l'aide d'une micro-pipette :

soit 1  $\mu$ l de sérum Humain

soit 3  $\mu$ l de sérum de Lapin.

### c) Migration électrophorétique

Les lames chargées d'antigène sont placées horizontalement à cheval entre les deux bacs de la cuve à électrophorèse contenant des quantités égales du tampon précédemment utilisé pour la préparation des plaques. On a soin de vérifier que les niveaux des liquides dans chaque bacs sont équilibrés.

Le contact entre le tampon et les plaques de gélose est assuré par des bandelettes de papier Whatmann n° 1 préalablement humectées de solution tampon.

La tension continue appliquée entre les électrodes est ajustée de façon que l'intensité du courant soit de 4 mA par plaque, valeur correspondant à une différence de potentiel entre les électrodes d'environ 90 V. Pendant la migration électrophorétique, les plaques d'Agar sont recouvertes pour éviter toute dessiccation, car dans ces conditions opératoires leur température peut atteindre 25 à 28°C.

### 2) Révélation immunologique

La migration électrophorétique terminée, nous retirons les plaques de la cuve à électrophorèse et enlevons la gélose de la rainure destinée à recevoir l'immunsérum. A l'aide d'une micro-pipette, nous la remplissons avec soin en évitant tout débordement qui entraînerait la formation d'artefacts.

Les quantités d'anticorps nécessaires sont : 50  $\mu$ l d'anti-sérum Humain et 80  $\mu$ l d'anti-sérum de Lapin.

Ces proportions antigène-anticorps doivent être respectées car les complexes antigènes-anticorps insolubles n'apparaissent que lorsque les deux substances se rencontrent dans certaines proportions. L'anti-sérum Humain préparé sur Lapin que nous utilisons est peu

sensible à l'excès d'anticorps. Il fournit des traits de précipitation épais en rapport avec la concentration relative de chaque fraction d'anticorps. L'immunsérum de type Chèvre présente la même qualité.

Les plaques de gélose soumises à l'électrophorèse et chargées d'immun-sérum sont mises dans une chambre humide où se fera la précipitation. Le temps nécessaires pour que la réaction se produise dépend de la concentration des réactifs, antigène et anticorps, et de la distance à laquelle on les dispose. Dans notre cas, nous obtenons la meilleure précipitation des corps d'immunisation au bout de 24 heures.

Après formation des arcs de précipitation, les plaques de gélose sont débarrassées des protéines restées solubles par immersion dans du sérum physiologique, puis dans de l'eau distillée. Ce lavage de l'Agar est indispensable, car lors de la coloration des arcs de précipitation, toutes les protéines solubles et non précipitées fixeraient le colorant et rendraient le document ininterprétable.

### 3) Autoradiographie et coloration

Après dessiccation, les plaques sont mises en contact avec un film radio KODIREX monocouche suivant la technique d'autoradiographie citée pour des électrophorèses sur acétate de cellulose et sur papier.

La coloration des arcs de précipitation se fait par le mélange suivant : noir Amido : 0,50 g ; acide acétique : 15 ml ; acétate de sodium : 3,40 g ; eau distillée : 500 ml. Les plaques sont immergées dans cette composition pendant quelques minutes, puis sont rincées à plusieurs reprises dans une solution acétique à 2 % jusqu'à coloration complète du support.

En superposant la plaque d'immuno électrophorèse et son autoradiographie, nous pouvons repérer exactement sur quelles protéines le composé mercuriel s'est fixé.

CHAPITRE VI

---

ETUDE DE LA FIXATION DU MHP PAR LES  
PROTEINES SERIQUES



## ETUDE DE LA LIAISON MHP - PROTEINES

### Comportement du MHP vis-à-vis de l'électrophorèse et de la chromatographie sur Séphadex

Avant d'étudier le transport de ce composé organo-mercuriel par les protéines sériques, nous avons analysé son comportement vis-à-vis des méthodes que nous avons employées.

#### A - Migration électrophorétique du MHP

Dans un champ électrique en présence d'un tampon alcalin, le MHP se charge négativement et migre ainsi que les protéines de la cathode vers l'anode.

Nous avons comparé l'action des différents tampons que nous avons utilisé au cours de notre étude, ainsi que l'influence possible des différents supports.

##### 1 - Electrophorèse sur acétate de cellulose humide

###### - Technique

Sur des bandes d'acétate de cellulose humide on dépose successivement à leur extrémité cathodique 1  $\mu$ l des solutions suivantes de MHP :

- a) solution mère de MHP de pH = 9,5 sur la première bande
- b) solution au dixième de cette première solution sur la deuxième
- c) solution au centième de la solution mère sur la troisième
- d) solution mère de MHP de pH = 8 sur la quatrième

La conduite de l'électrophorèse et la préparation des autoradiographies sont effectuées selon la technique que nous avons décrite ci-dessus.

## - Résultats

Les diverses solutions de MHP migrent toutes de la même façon pour un même tampon utilisé.

Pour les différents tampons de type MICHAELIS et pour le tampon Véronal, Véronal sodique, le MHP par comparaison avec l'électrophorégramme d'un sérum de Lapin migre à la même distance que les  $\gamma$  globulines (figure 19).

Pour le tampon ARONSSON et GRONWALL, toujours par comparaison avec un électrophorégramme de sérum nous observons une migration de MHP au-delà des albumines (figure 20).

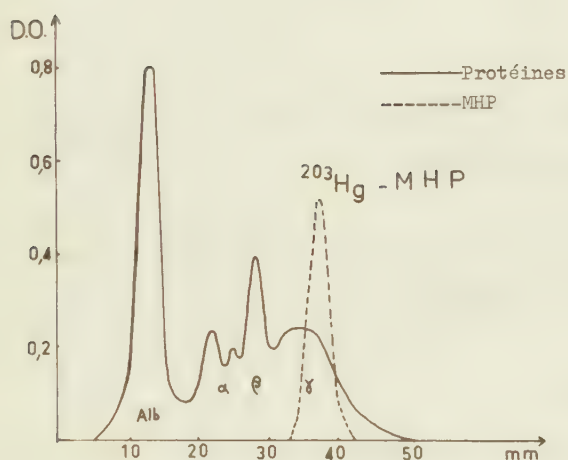


Figure 19 - Migration du MHP seul en comparaison avec un électrophorégramme de sérum de Lapin.  
La migration électrophorétique a été faite avec le tampon de MICHAELIS.

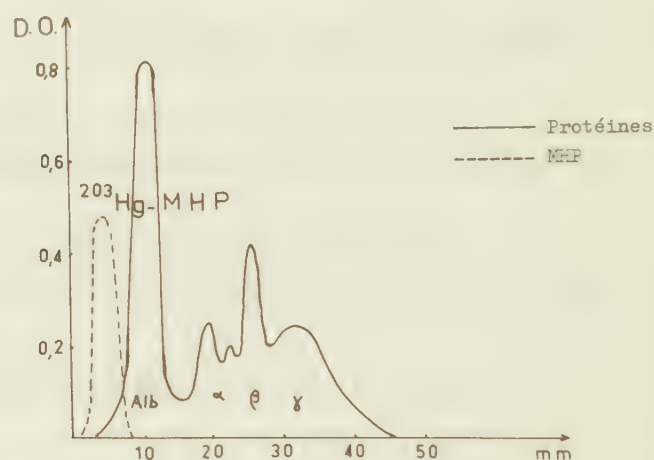


Figure 20 - Migration du MHP seul en comparaison avec un électrophorégramme de Lapin.  
La migration électrophorétique a été faite avec le tampon Tris EDTA.

## 2 - Electrophorèse sur acétate de cellulose sec

En reproduisant la même technique que pour le Cellogel, nous obtenons la même migration électrophorétique du MHP :

- Migration à la hauteur des  $\gamma$  globulines avec les tampons de MICHAELIS et le tampon Véronal, Véronal sodique,
- Migration au-delà de l'albumine avec le tampon ARONSSON et GRONWALL.

## 3 - Electrophorèse sur papier

La migration du MHP sur papier est strictement la même que celle sur acétate de cellulose.

L'étude du comportement du MHP vis-à-vis de l'électrophorèse nous montre qu'à l'exception du tampon ARONSSON et GRONWALL nous retrouvons le MHP libre à hauteur des  $\gamma$  globulines lors de l'étude de la fixation du MHP par les protéines sériques.

## B - Elution du MHP dans le Séphadex G. 200

La molécule de MHP est très petite, de poids moléculaire 319. Elle a peu de chance d'être retenue par le G. 200 dont la limite inférieure de rétention est représentée par des protéines de poids moléculaire 5 000. D'autre part, les solutions de MHP sont de densité identique à celle de l'éluant, ce qui entraîne une répartition homogène du MHP dans le Séphadex et une sortie régulièrement égale dans les éluats (figure 21).

L'étude du comportement du MHP vis-à-vis de la chromatographie sur Séphadex nous montre que lors de l'étude de la fixation du MHP par les protéines à l'aide de cette technique, nous pouvons repérer le MHP lié.

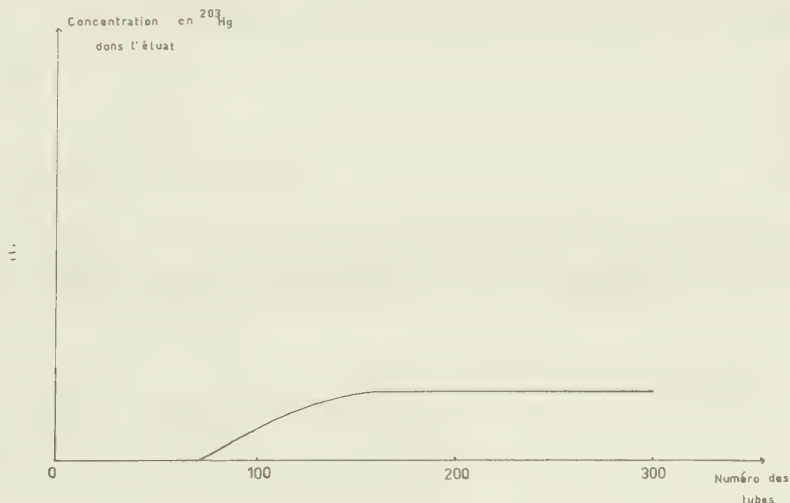


Figure 21 - Passage du MHP seul dans la colonne de Séphadex G. 200

## ETUDE IN VITRO DE LA LIAISON DU MHP AVEC LES PROTEINES SERIQUES

Nous nous proposons de rechercher une fixation éventuelle du composé organo-mercuriel avec les protéines sériques humaines et de lapin en appliquant les méthodes de séparation que nous avons décrites.

### I - Dialyse

Afin de savoir si le composé mercuriel se fixait in vitro aux protéines sériques dans les conditions les plus voisines possibles des conditions physiologiques, nous avons étudié la fixation du MHP aux protéines par dialyse contre une solution tampon millimolaire de pH = 7,4 composé de véronal sodique et de véronal.

#### - Technique

- Le mélange sérum - MHP est versé dans un sac à dialyse placé dans 200 ml de la solution tampon. L'ensemble est agité doucement à 37°.
- 16 heures, 24 heures, 40 heures, 4 jours après nous prélevons 2 ml de la solution tampon dans lesquels nous mesurons la quantité de mercure à l'aide d'un scintillateur à cristal creux.
- L'expérience a été faite aux concentrations de 5  $\mu\text{g}$ , 50  $\mu\text{g}$  et 100  $\mu\text{g}$  de mercure pour 1 g de protéines.

#### - Résultats

Par cette expérience de dialyse, nous voyons que le MHP se fixe in vitro aux protéines sériques dans des conditions voisines des conditions physiologiques comme nous le montrons dans le tableau X.

TABLEAU X

Etude de la fixation du MHP aux protéines sériques humaines par dialyse

| Temps         | 5 $\mu$ g de Hg/1 g de<br>protéines<br>= 18 000 cpm | 50 $\mu$ g de Hg/1 g de<br>protéines<br>= 200 000 cpm | 100 $\mu$ g de Hg/1 g de<br>protéines<br>= 412 000 cpm |
|---------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Bruit de fond | 65 cpm                                              | 60 cpm                                                | 62 cpm                                                 |
| 16 heures     | 68 cpm                                              | 8 900 cpm                                             | 18 600 cpm                                             |
| 24 heures     | 60 cpm                                              | 8 900 cpm                                             | 18 800 cpm                                             |
| 40 heures     | 1 910 cpm                                           | 116 000 cpm                                           | 210 000 cpm                                            |
| 4 jours°      | 17 800                                              | 178 000 cpm                                           | 381 000 cpm                                            |

A la dose de 5  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines nous observons une fixation totale du composé mercuriel par les protéines pendant 24 heures. Au bout de 40 heures, les protéines à la températures de 37°C commencent à se dénaturer et à libérer une partie du mercure fixé. Quatre jours après la mise en route de l'expérience, les protéines sont totalement dénaturées et nous retrouvons la presque totalité de la radioactivité dans la solution tampon.

A la dose de 50  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines, nous pouvons observer que tout le mercure n'est pas fixé. Dès la seizième heure nous retrouvons de la radioactivité dans la solution tampon.

A la dose de 100  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines, nous constatons que la proportion de MHP non fixée par les protéines s'est augmentée.

Une expérience identique faite avec le sérum de lapin offre les mêmes résultats d'une fixation totale du composé mercuriel à la dose de 5  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéine et d'une présence de mercure libre à partir de 50  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines.

## II - Electrophorèse

Les essais sont effectués :

- 1) sur des supports différents : acétate de cellulose humide, acétate de cellulose sec et papier afin de vérifier que le support n'intervient pas dans la fixation du MHP par les protéines.
- 2) avec deux sérums différents (Homme et Lapin) dont les mêmes fractions ont des mobilités différentes. On peut se demander si la fixation de composé mercuriel ne sera pas modifiée dans ces conditions.

## II. 1 - Acétate de cellulose gélatineux humide

Dans un premier temps, nous vérifierons l'action du temps de contact MHP - protéines, l'action de la température, ainsi que l'action de la dilution de la solution de MHP avant la migration électrophorétique en vue de déterminer les meilleures conditions de formation de cette liaison.

Dans un deuxième temps, nous étudierons la fixation du MHP sur les protéines à des doses croissantes ; en effet on peut espérer obtenir une fixation différente du composé mercuriel selon les quantités ajoutées.

Dans un troisième temps, nous terminerons notre étude par l'action de différents tampons sur le transport du MHP par les protéines.

### II. 1. 1 - Etude de la fixation du MHP aux protéines avec pour tampon d'électrophorèse le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et $\frac{r}{2} = 0,1$

Afin de connaître les meilleures conditions de fixation du MHP aux protéines, nous avons pour une même concentration de 1  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines fait systématiquement les études suivantes :

- Etude de temps de contact différents du sérum et du composé mercuriel à température ambiante avant la migration électrophorétique : 5 mn, 15 mn, 45 mn, 24 heures. Nous n'avons pu aller au-delà de 24 heures à température ambiante, les protéines se dénaturant.
- Etude de la fixation à différentes températures pendant 24 heures de contact avant la migration électrophorétique : - 28°, 4°, 37°.
- Etude de la fixation en utilisant différentes dilutions de la solution du MHP :  $\frac{1}{10}$ ,  $\frac{1}{50}$ ,  $\frac{1}{100}$ .

#### - Résultats

Nos expériences nous ont permis de constater que ni le temps de contact, ni la température de la mise en contact, n'intervenaient dans le transport du MHP par les protéines sériques au cours de la migration électrophorétique. La dilution de la solution de MHP par contre intervient (figures 22 A et B). Nous observons pour la solution MHP non diluée une fixation plus large au niveau des  $\alpha$  globulines (B) tandis que la solution au  $\frac{1}{100}$  présente une fixation nette au niveau d'une seule  $\alpha$  globuline (A).

Dans la suite de nos expériences, pour opérer de façon constante, nous avons adopté le protocole suivant : mise en contact pendant 5 mn à 37° avec agitation du sérum et du composé mercuriel dilué au  $\frac{1}{100}$ . Le sérum utilisé était au maximum vieux de 24 heures après conservation à 4° et la solution mère de MHP avait un pH de 9,5.

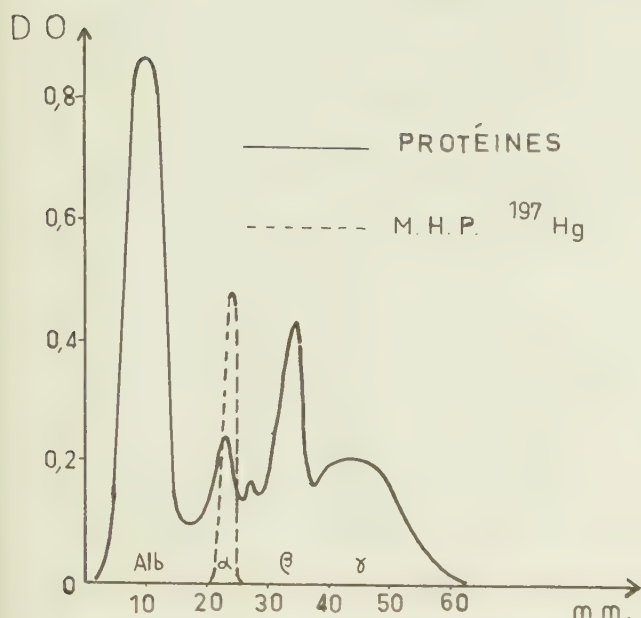


Figure 23 - Fixation du MHP par les  $\alpha$  globulines.

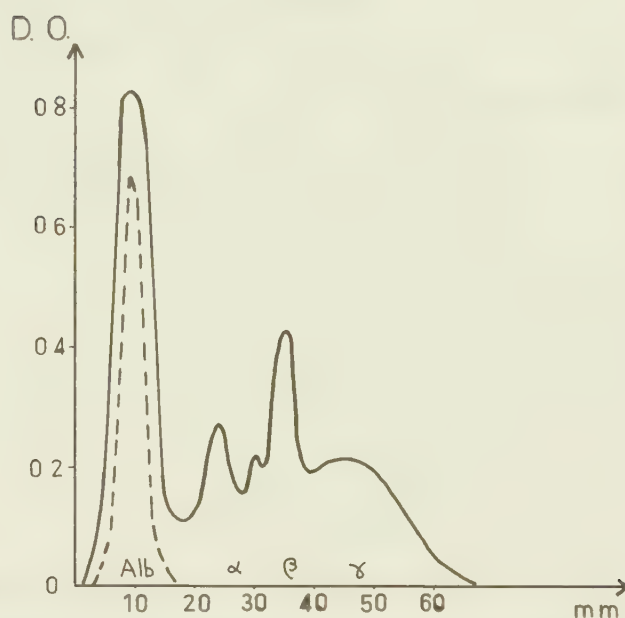


Figure 24 A - Fixation du MHP par les albumines.

II. 1. 2 - Etude de la fixation de MHP aux protéines, à différentes concentrations de Hg par rapport à 1 g de protéines en utilisant le tampon de MICHAELIS de pH 8, 6 et  $\frac{\Gamma}{2} = 0,1$  pour tampon d'électrophorèse

La concentration en mercure d'une solution de MHP est calculée par le rapport de l'activité spécifique (nombre de mCi/ml de mercure) et de l'activité volumique (nombre de mCi/ml de solution).

La concentration en protéines par ml de sérum est évaluée par densitométrie à 280 m $\mu$ .

- Résultats

Jusqu'à la dose de 5  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines, nous observons la fixation du composé mercuriel sur une seule protéine globuline, se situant au niveau des  $\alpha$  globulines (figure 23). Les  $\gamma$  globulines puis des  $\beta$  globulines fixent le MHP au fur et à mesure que la quantité de Hg par g de protéine augmente. A la dose de 100  $\mu$ g de Hg nous aurons une fixation sur toutes les fractions protéiques, même sur les albumines mais à l'état de trace (tableau XI).

TABLEAU XI

Etude de la fixation du MHP aux protéines à différentes concentrations de mercure pour 1 g de protéines

| Quantité de Hg/1 g de protéines | Fractions protéiques |          |         |          |     |
|---------------------------------|----------------------|----------|---------|----------|-----|
|                                 | Dépôt                | $\gamma$ | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| 1 $\mu$ g                       |                      |          |         | +        |     |
| 5 "                             |                      |          |         | ++       |     |
| 10 "                            |                      | +        |         | ++       |     |
| 20 "                            |                      | +        | +       | ++       |     |
| 30 "                            |                      | ++       | +       | ++       |     |
| 50 "                            | +                    | ++       | +       | ++       |     |
| 100 "                           | +                    | ++       | +       | ++       | +   |

Le MHP libre migrant à un niveau très voisin des  $\gamma$  globulines (figure 19), il nous est difficile par la méthode électrophorétique de savoir si à partir de 10  $\mu$ g de Hg nous ne sommes pas en présence de MHP libre, plutôt que de MHP fixé par les  $\gamma$  globulines.

II. 1. 3 - Etude de la fixation du MHP aux protéines sériques en utilisant différents tampons d'électrophorèse

Les différents tampons utilisés ont été cités dans la technique d'électrophorèse au Chapitre V. Rappelons :

- les tampons universels type MICHAELIS de pH variant de la valeur 9,5 à 7,4 et de force ionique voisine de 0,1
- le tampon véronal sodique, véronal de pH = 8,6 et de  $\frac{\Gamma}{2} = 0,079$
- le tampon ARONSSON et GRONWALL de pH = 8,9 et de  $\frac{\Gamma}{2} = 0,08$ .

Pour l'étude de l'influence de ces différents tampons sur le transport du MHP par les protéines au cours de la migration électrophorétique a été faite avec 1  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines, à l'exception du tampon véronal pour lequel nous avons étudié des doses croissantes de Hg.

- Résultats

1) Les variations de pH du tampon de MICHAELIS, ainsi que l'utilisation du tampon véronal sodique, véronal et du tampon tris-EDTA nous permettent de constater que le transport

du MHP par les protéines peut être modifié par la nature du tampon au cours de la migration électrophorétique. Par ces expériences nous voyons qu'au pH 7,4 du tampon MICHAELIS, correspondant au pH du sérum lui-même, nous obtenons une fixation du MHP sur la fraction albuminique (tableau XII). Si nous modifions le pH de ce même tampon nous observons une fixation sur d'autres protéines que l'albumine.

TABLEAU XII

Etude des variations de tampon sur la liaison MHP-protéines

| Tampon                                              | Dépôt    | Fractions protéiques |         |          |     |
|-----------------------------------------------------|----------|----------------------|---------|----------|-----|
|                                                     |          | $\gamma$             | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| Tampon de<br>MICHAELIS<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,1$  | pH = 9,5 |                      |         |          | +   |
|                                                     | pH = 9   |                      |         |          | +   |
|                                                     | pH = 8,8 |                      |         | +        |     |
|                                                     | pH = 8,6 |                      |         | +        |     |
|                                                     | pH = 8,4 |                      |         | +        |     |
|                                                     | pH = 8,2 |                      |         | +        |     |
|                                                     | pH = 8   |                      |         |          | +   |
|                                                     | pH = 7,4 |                      |         |          |     |
| Tampon de<br>MICHAELIS<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,07$ | pH = 8,6 |                      |         | +        |     |
| Tampon Véronal<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,075$        | pH = 8,5 |                      |         |          | +   |
| Tampon Tris<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,08$            | pH = 8,8 |                      |         |          | +   |

A partir de pH = 8,2 et jusqu'à pH = 8,8 le MHP se trouve fixé au niveau des  $\alpha$  globulines (figure 23). A des pH inférieurs à 8,2 et supérieurs à 8,8 le MPH est fixé par l'albumine (figures 24 A et B). Le tampon MICHAELIS de pH = 8,6 et de  $\frac{\Gamma}{2} = 0,07$  entraîne la même fixation par les  $\alpha$  globulines que le tampon MICHAELIS de pH = 8,6 et  $\frac{\Gamma}{2} = 0,1$ . Les tampons tris-EDTA et véronal, véronal sodique présentent à pH = 8,6 une fixation du MHP par la fraction albuminique (figure 25).

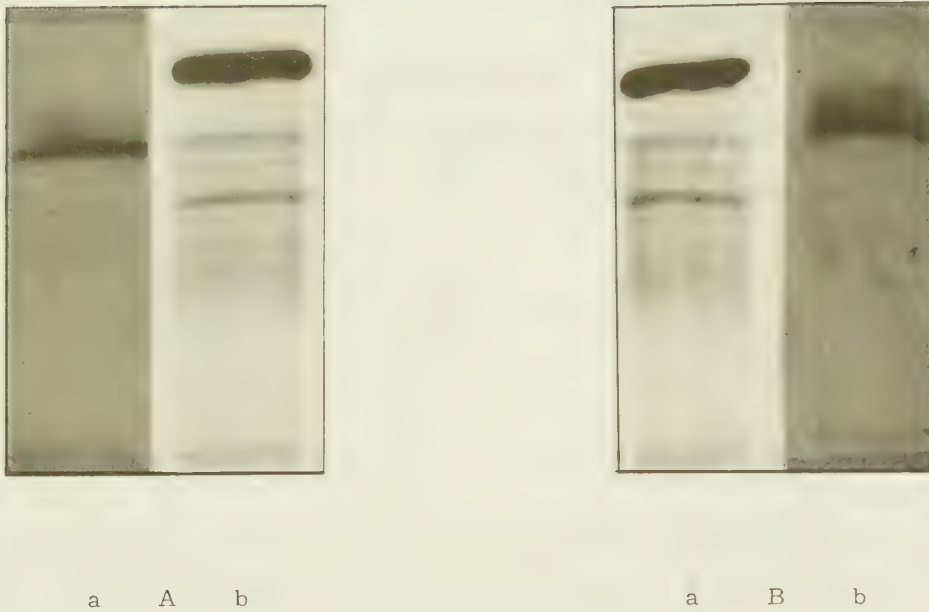


Figure 22 - Fixation du MHP par les  $\alpha$  globulines

A : Fixation nette sur une seule globuline

B : Fixation sur plusieurs globulines

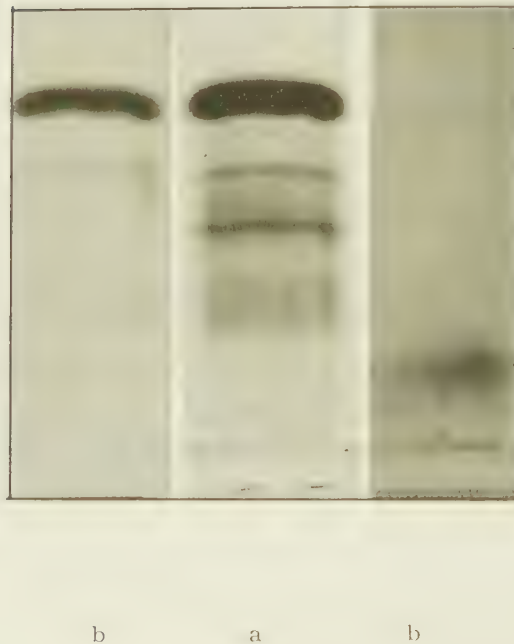


Figure 24 B - Fixation du MHP par l'albumine et migration du MHP seul

a : autoradiographie

b : électrophorégramme

2) L'étude de la fixation de doses croissantes de MHP avec les protéines sériques montre qu'aux doses les plus faibles le MHP est fixé préférentiellement par les albumines, puis les  $\alpha$  globulines et en continuant à augmenter les doses, par les  $\gamma$  globulines et enfin par les  $\beta$  globulines avant de trouver du MHP libre, à la dose de 50  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines.

TABLEAU XIII

Fixation du MHP aux protéines sériques après migration  
électrophorétique avec le tampon Véronal

| Quantité de Hg/1 g de protéines | Fractions protéiques |          |         |          |     |
|---------------------------------|----------------------|----------|---------|----------|-----|
|                                 | Dépôt                | $\gamma$ | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| 1 $\mu$ g                       |                      |          |         |          | +   |
| 5 "                             |                      |          |         |          | ++  |
| 10 "                            |                      |          |         | +        | ++  |
| 20 "                            |                      | +        |         | +        | ++  |
| 30 "                            |                      | +        | +       | +        | ++  |
| 50 "                            | +                    | +        | +       | +        | ++  |
| 100 "                           | +                    | +        | +       | +        | ++  |

Dans le protocole opératoire, nous avons mentionné que nous utilisons des solutions mères de MHP ayant un pH de 9,5. Le MHP, comme nous l'avons montré dans le Chapitre II, n'est pas un composé organo-mercuriel stable et il arrive que le jour même de sa fabrication les solutions mères que nous recevons aient un pH voisin de 8. Dans ce cas, la fixation du MHP par les protéines en présence de tampon MICHAELIS de pH = 8,6 se produit au niveau de toutes les fractions protéiques (figure 25), quelle que soit la concentration en Hg par g de protéines.

## II. 2 - Support d'acétate de cellulose gélatineuse sec

La technique d'électrophorèse, la préparation des autoradiographes et des électrophorégrammes sont ceux que nous avons déjà indiqués dans le Chapitre IV.

Nous avons adopté le protocole opératoire établi pour le Cellogel, c'est-à-dire : mise en contact pendant 5 mn à 37° avec agitation du sérum et du composé mercuriel dilué au  $\frac{1}{100}$ . Les sérums de lapin utilisés sont au maximum vieux de 24 heures après conservation à 4°C et les solutions mères de MHP ont un pH de 9,5.

L'étude de l'action des différents tampons d'électrophorèse a été faite avec les tampons cités précédemment. La concentration de mercure par gramme de protéines était de 1  $\mu$ g.

- Résultats

Nous observons sur l'acétate de cellulose sec strictement la même fixation que dans le cas du Cellogel. Pour le tampon MICHAELIS entre pH 9 et pH 8 le MHP se fixe sur les  $\alpha$  globulines dans tous les autres cas nous le trouvons fixé au niveau des albumines (figure 23 et tableau XIV).

- Remarque

Dans le mode opératoire de la technique d'électrophorèse sur support d'acétate de cellulose, nous avons choisi afin d'éviter une détérioration de la liaison composé mercuriel-protéines un ampérage aussi faible que possible (2,5 mA par bandes) compatible avec une bonne séparation des fractions protéiques. Avec le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 la migration électrophorétique durait 2 h 15 mn. Nous avons vérifié que si nous augmentions l'intensité du courant à 5 mA par bande et diminuions le temps de migration à 1 h 30 mn nous obtenions un électrophorégramme identique à ceux obtenus après migration pendant 2 h 15 mn et une fixation du MHP sur les  $\alpha$  globulines de façon identique aux expériences précédentes.

TABLEAU XIV

Etude de l'influence de différents tampons sur la liaison protéines-MHP  
au cours de la migration électrophorétique sur acétate de cellulose sec

| Tampon                                                                       | Fractions protéiques |          |         |          |     |
|------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------|---------|----------|-----|
|                                                                              | Dépôt                | $\gamma$ | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| Tampon de MICHAELIS<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,1$ pH = 9<br>pH = 8,6<br>pH = 8 |                      |          |         |          | +   |
|                                                                              |                      |          |         | +        |     |
|                                                                              |                      |          |         |          | +   |
| Tampon Véronal<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,075$ pH = 8,6                        |                      |          |         |          | +   |
| Tampon Tris<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,08$ pH = 8,8                            |                      |          |         |          | +   |

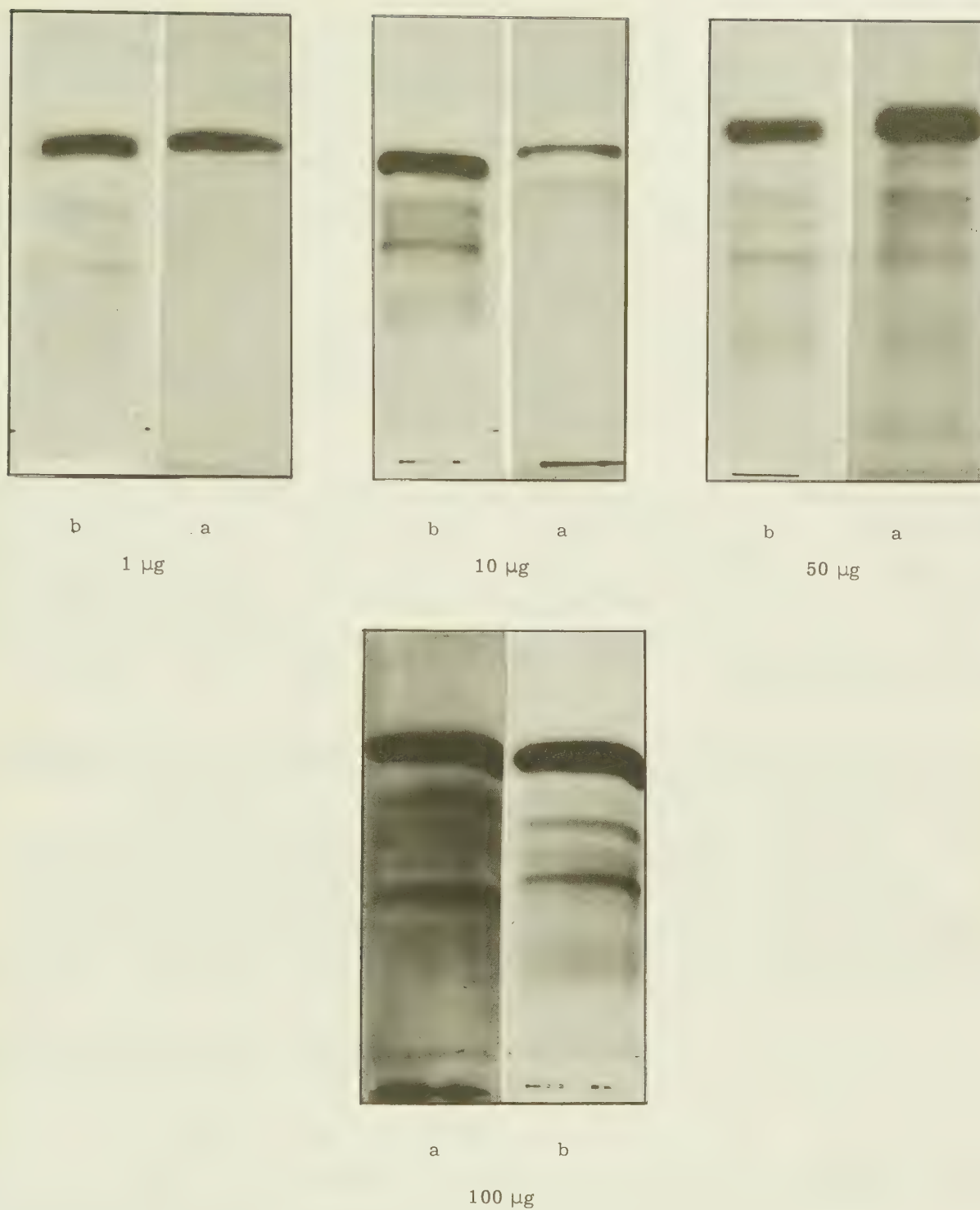


Figure 25 - Fixation de doses croissantes de MHP par les protéines sériques. La migration électrophorétique a été faite avec le tampon véronal, véronal sodique.

a : autorariographie

b : électrophorégramme

TABLEAU XV

Etude de l'influence de différents tampons sur la liaison protéines-MHP  
au cours de la migration électrophorétique sur papier

| Tampon                                                                       | Fractions protéiques |          |         |          |     |
|------------------------------------------------------------------------------|----------------------|----------|---------|----------|-----|
|                                                                              | Dépôt                | $\gamma$ | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| Tampon de MICHAELIS<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,1$ pH = 9<br>pH = 8,6<br>pH = 8 |                      |          |         | +        | +   |
| Tampon Véronal<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,075$ pH = 8,6                        |                      |          |         |          | +   |
| Tampon Tris<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,08$ pH = 8,8                            |                      |          |         |          | +   |

II. 3 - Support de papier

Les conditions d'études sur support de papier ont été indiquées dans la technique d'électrophorèse sur papier Chapitre V.

Le protocole opératoire est le même que pour les deux supports d'acétate de cellulose : c'est-à-dire mise en contact pendant 5 mn avec agitation à 37° du sérum et du composé mercuriel dilué au  $\frac{1}{100}$ . Les sérums de Lapin et d'Homme utilisés sont au maximum vieux de 24 heures après conservation à 4°C et les solutions mères de MHP ont un pH de 9,5.

- Résultats

Nous retrouvons les mêmes résultats pour le support de papier que pour les supports d'acétate de cellulose (tableau XV).

Le tampon de MICHAELIS entre pH = 9 et pH = 8 présente une fixation du MHP au niveau des  $\alpha$  globulines (figure 26).

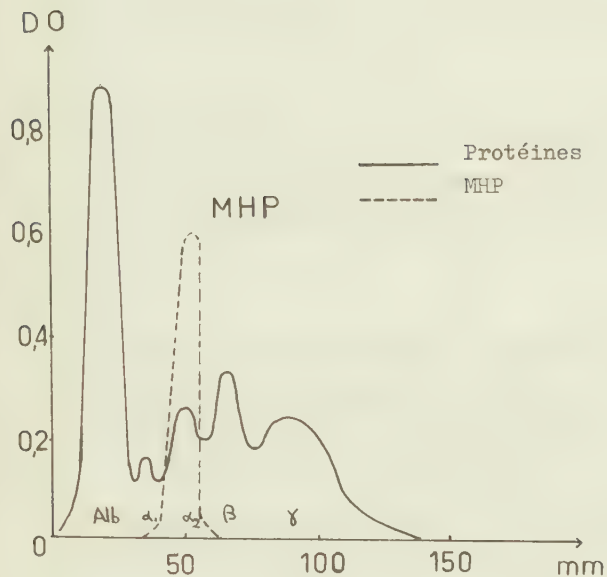


Figure 26 - Fixation du MHP par les  $\alpha$  globulines humaines. Electrophorèse sur papier faite avec le tampon de MICHAELIS.

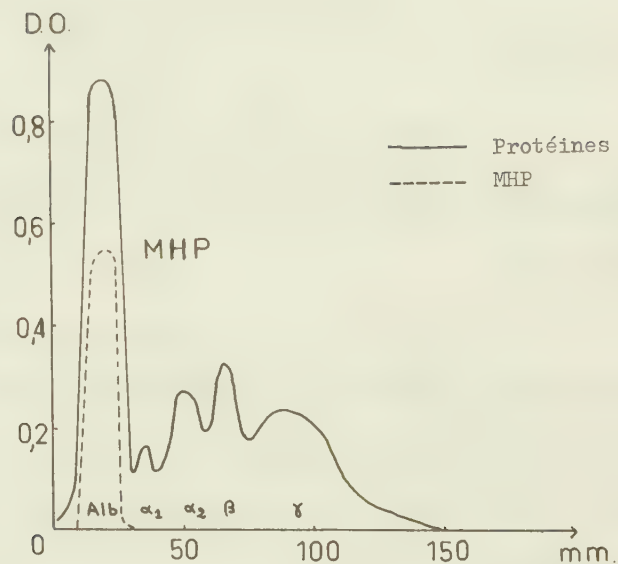


Figure 27 - Fixation du MHP par les albumines humaines. Electrophorèse sur papier faite avec le tampon Véronal-Véronal sodique.

Tous les autres tampons présentent une fixation du MHP au niveau de l'albumine (figure 27).

### III - Chromatographie sur colonne Séphadex

#### - Technique

Les essais ont été effectués avec deux tampons différents : le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et le tampon recommandé par KILLANDER cité dans le Chapitre V.

Afin de pouvoir détecter la radioactivité par comptage dans un scintillateur à cristal creux, nous avons dû augmenter la quantité de mercure radioactif par g de protéines. Pour le  $^{203}\text{Hg}$  nous avons adopté 20  $\mu\text{g}$  de Hg pour 1 g de protéines.

Nous avons conservé le protocole opératoire de préparation du mélange sérum-composé mercuriel utilisé pour l'électrophorèse. Le sérum frais est mis en contact avec une solution de MHP diluée au  $\frac{1}{100}$  dont la solution mère avait un pH initial de 9,5. Le mélange est agité 5 mn à 37°C.

Les expériences ont été faites avec du sérum humain et sérum de lapin préparés selon le processus indiqué dans le Chapitre V.

Pour une colonne de G. 200 de 70 cm de hauteur nous introduisons 8 ml du mélange sérum - MHP. La chromatographie, la collection de l'éluat, le dosage des protéines et de la radioactivité contenues dans chacun des tubes sont réalisés selon le mode opératoire décrit au Chapitre V.

Après séparation des protéines par chromatographie, les éluats correspondants aux sommets de la courbe représentative de la chromatographie sont soumis à la lyophilisation. La poudre obtenue, remise en solution dans le tampon éluant est soumise à une électrophorèse sur cellogel et la radioactivité est localisée par autoradiographie. Les électrophorèses sur cellogel sont faites avec le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et le tampon véronal-véronal sodique.

## - Résultats

### III. 1 - Séparation des protéines par chromatographie

Par chromatographie sur Séphadex G. 200, nous obtenons un fractionnement du sérum en trois groupes de protéines bien distincts (figure 28). Après lyophilisation on concentre chacun de ces fractionnements en vue de la migration électrophorétique de chacun d'eux. Nous constatons alors que la séparation par chromatographie a permis d'isoler les protéines de la façon suivante :

- la première fraction contient les  $\beta$  globulines,
- la deuxième fraction contient les  $\gamma$  globulines et quelques  $\alpha$  globulines,
- la troisième fraction contient toutes les albumines et le reste des  $\alpha$  globulines.

### III. 2 - Fixation du MHP par les protéines

#### III. 2. 1 - Résultats après chromatographie sur Séphadex

Nous avons décelé les premières traces de radioactivité avec les premières protéines apparaissant dans l'éluat, c'est-à-dire les  $\beta$  globulines. La courbe de la radioactivité nous permet de voir qu'à la dose de 20  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines, le MHP est fixé sur les

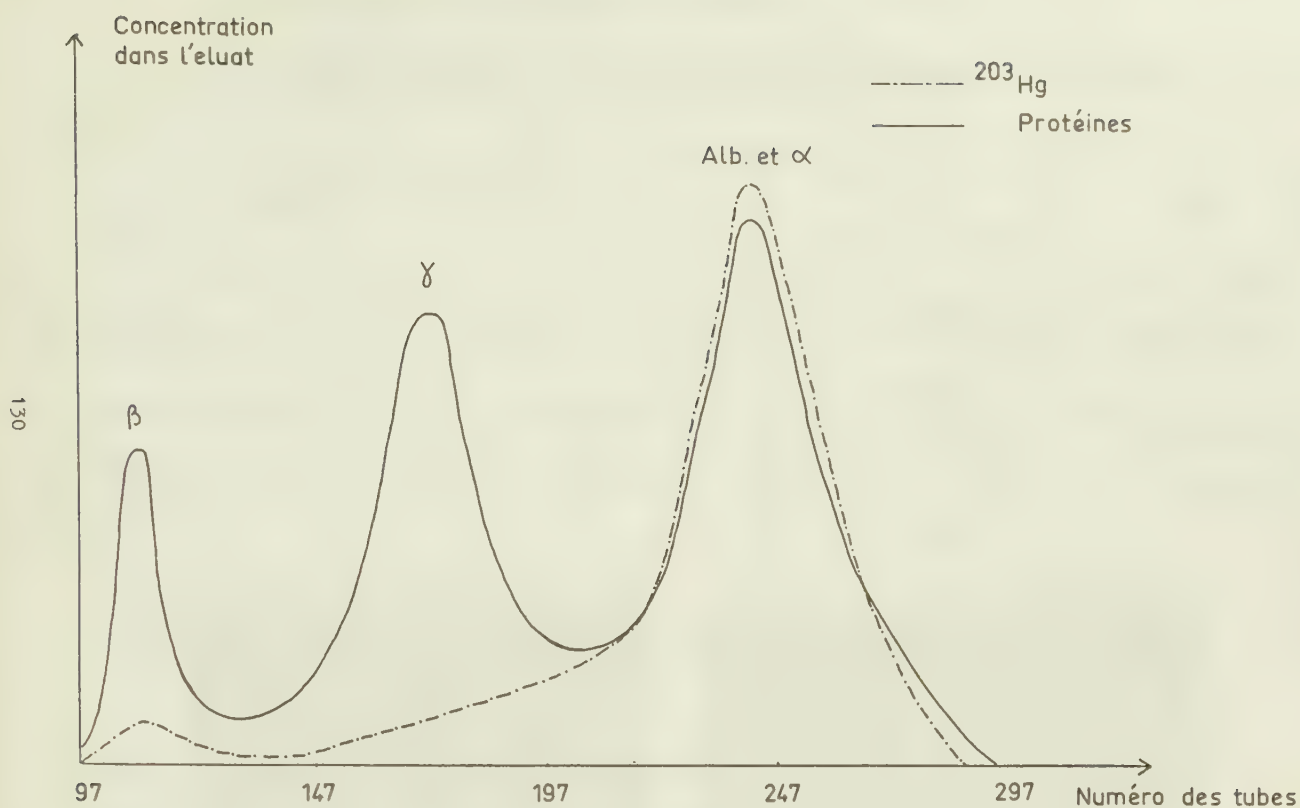


Figure 28 - Passage sur colonne de Séphadex G. 200 du mélange de sérum et de MHP.

β protéines, les γ protéines ainsi que sur le groupe formé de l'albumine et des α globulines. Tout le MHP semble s'être fixé aux protéines car nous n'avons pu déceler de radioactivité avant l'apparition des premières fractions protéiques ni après les dernières.

Quelle que soit la composition de l'éluant : tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 ou tampon recommandé par KILLANDER, la fixation du MHP semble être la même après la chromatographie (tableau XVI).

TABLEAU XVI

Fixation du MHP sur les fractions protéiques obtenues après chromatographie

| Eluant    | Fractions protéiques |   |    |     |
|-----------|----------------------|---|----|-----|
|           | β                    | γ | α  | Alb |
| KILLANDER | +                    | + | ++ | ++  |
| MICHAELIS | +                    | + | ++ | ++  |

TABLEAU XVII

Fixation du MHP sur les fractions protéiques obtenues après chromatographie  
et soumises à l'électrophorèse

| Eluant                 | Tampon<br>d'électrophorèse | Fractions protéiques |         |          |     |
|------------------------|----------------------------|----------------------|---------|----------|-----|
|                        |                            | $\gamma$             | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| Tampon de<br>MICHAELIS | Véronal                    | +                    |         |          | +   |
|                        | Michaelis                  | +                    |         | +        |     |
| Tampon de<br>KILLANDER | Véronal                    | +                    |         |          | +   |
|                        | Michaelis                  | +                    |         | +        |     |

III. 2. 2 - Résultats après séparation électrophorétique sur Cellogel des trois fractions  
protéiques

Les autoradiographies des électrophorèses faites à partir des lyophilisats des trois  
fractions protéiques obtenues après la séparation chromatographique sur Séphadex G. 200 nous  
donnent les résultats suivants :

Quel que soit le tampon utilisé pour éluant, si la migration électrophorétique est  
faite avec le tampon véronal, véronal sodique le MHP se trouve fixé aux  $\alpha$  globulines et à l'albu-  
mine. Si la migration électrophorétique est faite avec le tampon de MICHAELIS de pH = 8, 6, le  
MHP se trouve fixé aux  $\alpha$  globulines et à des  $\gamma$  globulines (tableau XVII).

IV - Immuno-électrophorèse

L'étude de fixation du MHP aux protéines sériques par immuno-électrophorèse a  
été réalisée selon le mode opératoire décrit dans le Chapitre V.

De même que pour les techniques d'électrophorèse et de chromatographie, les essais  
d'immuno-électrophorèse ont été faits avec deux tampons différents : le tampon de MICHAELIS  
de pH = 8, 6 et le tampon véronal sodique de pH = 8, 2 cité dans le mode opératoire.

La quantité de Hg par g de protéines a dû être augmentée car seule la radioactivité  
des protéines précipitées par les anticorps est détectée, toutes les autres protéines ayant été  
éliminées par le lavage des plaques. Pour le  $^{203}\text{Hg}$  nous n'avons pu déceler par autoradiographie  
moins de 10  $\mu\text{g}$  de Hg pour 1 g de protéines.

Les essais ont été faits avec du sérum Humain et du sérum de Lapin.

Le mélange de sérum et de MHP a été fait suivant le protocole établi au début de ce Chapitre.

- Résultats

Quel que soit le tampon utilisé, nous n'avons observé aucune différence. A la dose de 10  $\mu$ g le composé mercuriel est fixé par toutes les fractions protéiques (figure 29).

Il est à remarquer que le MHP ne dénature pas les protéines et ne les empêche pas de réagir avec leur anticorps pour former l'immuno-précipité.

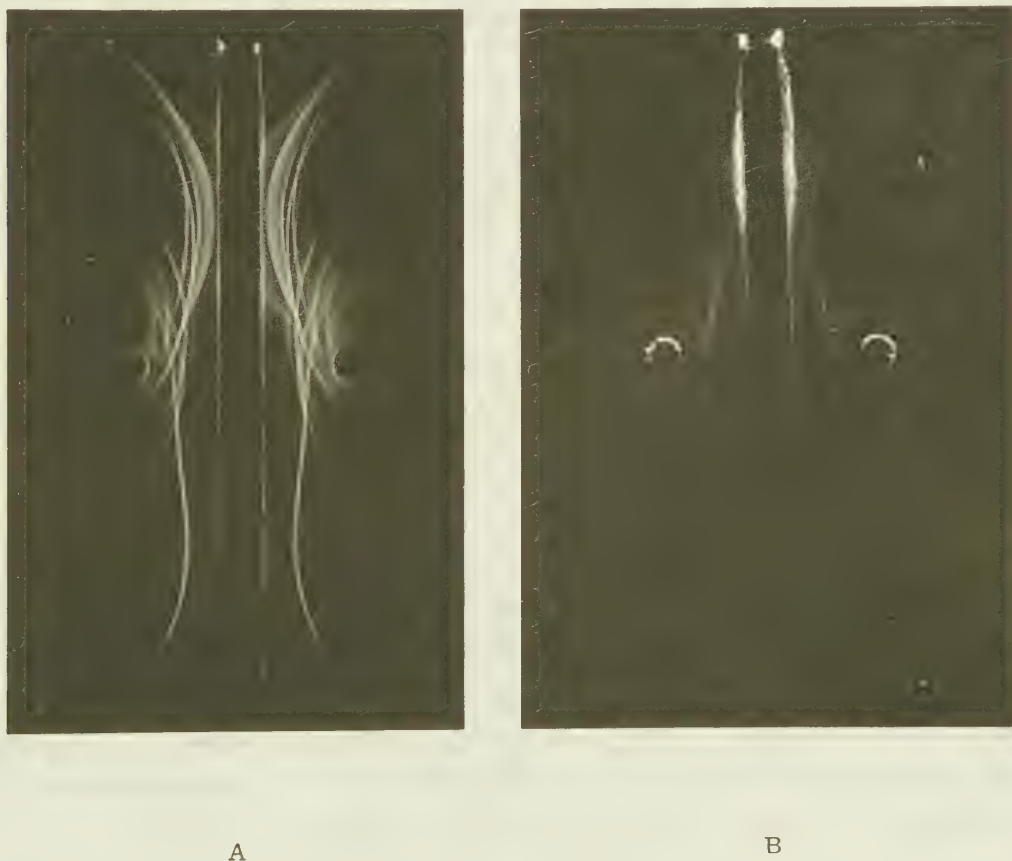


Figure 29 - Fixation du MHP par les protéines sériques Humaines

A - Immunoélectrophorèse

B - Autoradiogramme correspondant

## ACTION DE L'ALBUMINE ET DES GLOBULINES HUMAINES SUR LE MHP

Lors de l'étude de la fixation du MHP par toutes les protéines sériques, nous avons constaté que l'albumine et les  $\alpha$  globulines avaient un rôle important. Le mercure à des doses voisines de 1  $\mu$ g se situait sur les unes ou les autres protéines selon que l'étude de cette fixation était faite par migration électrophorétique en présence du tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 ou d'un autre tampon.

Nous avons cherché à étudier la liaison du MHP avec de l'albumine humaine pure et avec un mélange d'albumine et d'  $\alpha$  globulines dans les proportions de 98 % et de 2 %, par la méthode d'électrophorèse sur cellogel en présence de tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et de tampon véronal-véronal sodique.

Ce phénomène de compétition entre l'albumine et les  $\alpha$  globulines ne se produisant qu'au cours de la migration électrophorétique, nous n'avons pas voulu faire cette étude par les autres méthodes de séparation des protéines.

### - Technique

Nous mettons en contact les solutions d'albumines d'une part, d'albumines et d'  $\alpha$  globulines d'autre part avec une solution au  $\frac{1}{100}$  de MHP de façon que la concentration en mercure par rapport au taux des protéines soit de 1  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines. Les mélanges sont laissés en contact pendant 5 mn à 37° avec agitation avant d'être soumis à la migration électrophorétique soit en présence de tampon de MICHAELIS de pH = 8,6, soit en présence de tampon véronal de même pH.

La technique d'électrophorèse, la préparation des autoradiographies et des électrophorégrammes sont celles que nous avons indiqué dans le Chapitre V.

- Résultats

1°- Résultats obtenus avec le tampon de MICHAELIS

En présence de tampon de MICHAELIS et à la dose de 1  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines, nous avons calculé d'après les autoradiographies obtenues (figure 30) que l'albumine pure et l'albumine mélangée à des  $\alpha$  globulines fixaient environ 54 % de la quantité de MHP. Dans le cas de l'albumine pure, nous trouvons au niveau de l'endroit où le MHP libre migre environ 33 % de la radioactivité. Les 33 % de l'activité restante étant répartis uniformément entre le dépôt et la zone de fixation par l'albumine. Dans le cas de l'albumine en présence de globulines, les 33 % de l'activité trouvée dans l'expérience précédente au niveau du MHP libre se situent au niveau des  $\alpha$  globulines et il n'y a pas de trace du produit mercuriel non fixé (figure 31).

2°- Résultats obtenus avec le tampon véronal

Dans le cas du tampon véronal, pour la même quantité de 1  $\mu$ g de Hg par g de protéines, nous observons en présence d'albumine pure ou d'albumine mélangée à des  $\alpha$  globulines une radioactivité de 98 % au niveau des albumines et aucune trace nette d'activité sur les  $\alpha$  globulines ou à l'emplacement de migration du MHP libre.

Les résultats ont été rassemblés dans les tableaux XIX et XX.

TABLEAU XIX

Fixation du MHP par l'albumine pure

| Tampon    | % d'activité |           |       |
|-----------|--------------|-----------|-------|
|           | Alb          | MHP libre | Dépôt |
| MICHAELIS | 54 %         | 33 %      | 13 %  |
| VERONAL   | 98 %         |           |       |

TABLEAU XX

Fixation du MHP par le mélange albumine,  $\alpha$  globulines

| Tampon    | % d'Activité |                    |       |
|-----------|--------------|--------------------|-------|
|           | Alb          | $\alpha$ MHP libre | Dépôt |
| MICHAELIS | 54 %         | 33 %               | 13 %  |
| VERONAL   | 98 %         |                    |       |

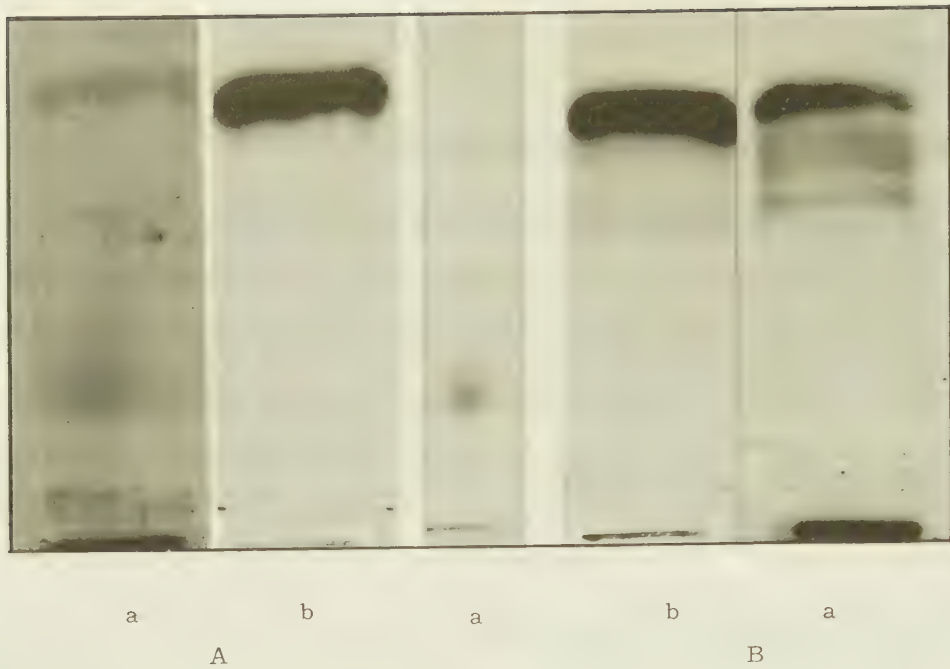


Figure 30 - Fixation du MHP

A - par de l'albumine pure

B - par le mélange de 98 % d'albumine et 2 % de globulines

Migration électrophorétique faite avec le tampon de MICHAELIS.



Figure 31 - Fixation du MHP par de l'albumine pure.

Migration électrophorétique faite avec le tampon véronal.

a : autoradiographie

b : électrophorégramme

## CONCLUSION

L'étude du mélange de sérum et de MHP à l'aide de techniques que nous avons utilisées permet de constater que ce composé mercuriel se fixe aux protéines sériques.

Le MHP seul migre à peine à la même distance que les  $\gamma$  globulines et lors des électrophorèses du mélange sérum-MHP, nous retrouvons le MHP au niveau soit des albumines, soit des globulines.

La technique d'électrophorèse nous a permis de constater qu'à la dose de 1  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines, le MHP se fixait sur une seule fraction protéique qui suivant le tampon utilisé pour la migration électrophorétique pouvait être l'albumine ou une  $\alpha$  globuline. La liaison avec une  $\alpha$  globuline ne se produit qu'en présence d'un seul tampon bien défini, le tampon universel de MICHAELIS, dans une certaine zone de pH de ce tampon, entre pH 8,8 et pH 8,2 et pour des solutions stables du composé mercuriel, c'est-à-dire de pH 9,5.

Nous essayerons au cours de la discussion de donner une explication à ce phénomène. A l'exception du cas particulier du tampon de MICHAELIS, en augmentant les quantités de MHP par rapport au taux de protéines, nous observons une fixation de l'organo-mercuriel sur les fractions protéiques les unes après les autres : d'abord les albumines puis les  $\alpha$  globulines et les  $\gamma$  globulines et enfin les  $\beta$  globulines avant que nous ne le retrouvions à l'état libre et ceci à partir de la dose de 50  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines. Dans le cas du tampon de MICHAELIS, il semble que les sites de liaison de l'albumine soient bloqués et qu'il faille une quantité importante de MHP pour obtenir une fixation. Peut-être intervient-il alors d'autres sites de liaisons de la protéines ?

La chromatographie sur colonne nous a permis de confirmer qu'à la dose de 20  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines, la bande radioactive située sur l'autoradiographie au niveau des  $\gamma$  globulines correspond bien à une fixation du composé mercuriel par ces protéines et non à une migration du MHP libre.

Les différents éluants utilisés pour la séparation des protéines par chromatographie n'interviennent pas sur la liaison MHP - protéines. En effet, après élution de la colonne par le tampon de MICHAELIS et reprise par ce même tampon des lyophilisats des trois fractions protéiques obtenues, les résultats des autoradiographies diffèrent selon que les électrophorégrammes ont été soumis au tampon de MICHAELIS ou au tampon véronal au cours de la migration électrophorétique. Il semble donc que la modification de ce transfert du MHP entre les albumines et les  $\alpha$  globulines ne se produise qu'au cours de la migration électrophorétique sous l'influence d'un certain tampon. Cette technique de séparation des protéines pourrait provoquer un décrochage du MHP de son site de fixation sur les albumines et le MHP libre se trouverait alors au niveau des globulines.

Les essais faits en présence d'albumine pure et du mélange albumine,  $\alpha$  globulines nous confirment le phénomène de compétition entre ces deux fractions protéiques et le phénomène d'inhibition de la liaison MHP-albumine au cours de la migration électrophorétique en présence de tampon de MICHAELIS de pH = 8,6. En effet, alors qu'avec le tampon véronal, nous trouvons 98 % de l'activité au niveau de l'albumine, que nous soyons en présence d'albumine pure ou mélangée à des  $\alpha$  globulines, avec le tampon de MICHAELIS, nous observons que presque 50 % du produit n'est pas fixé sur l'albumine, et se retrouve libre si l'albumine est pure, au niveau des  $\alpha$  globulines si l'albumine est mélangée. Nous noterons dans ce cas que malgré la disproportion entre le pourcentage des albumines et des  $\alpha$  globulines qui est de 2 %, la différence de radioactivité entre les deux fractions est d'environ 20 %. La perte du composé mercuriel par l'albumine est indépendante du taux des  $\alpha$  globulines puisqu'elle est la même quand l'albumine est seule ou en présence d' $\alpha$  globulines. Tout semble se passer comme si le produit radioactif libéré par les premières fractions protéiques qu'il rencontre, c'est-à-dire les  $\alpha$  globulines.

La technique d'immuno-électrophorèse nous a apporté un complément d'information pour le sérum Humain en nous permettant dans le cas général, c'est-à-dire en présence de tampon véronal de connaître exactement les protéines sur lesquelles le MHP se fixe. Cette technique ne nous a pas apporté de solution dans le cas du tampon de MICHAELIS.

Si les différentes techniques que nous avons utilisé nous ont permis de connaître les protéines fixant ce composé mercuriel, elles ne nous ont pas permis de conclure sous quelle modalité se forme la liaison MHP - protéines. Tout ce que nous avons pu constater, ce n'est pas en fait la liaison de l'organo-mercuriel aux protéines, mais seulement la liaison du Hg aux protéines. Nous ignorons sous quelle forme ionisée se trouve le MHP et si ce n'est pas l'ion  $\text{Hg}^{2+}$  seul que nous avons étudié.

Enfin les deux sérums, d'Homme et de Lapin ne présentent aucune différence dans le transport du MHP par les protéines. Nous retrouvons chez les deux la modification de transport par le tampon de MICHAELIS.

CHAPITRE VII

ETUDE DE LA FIXATION DE LA CHLORMERODRINE  
PAR LES PROTEINES SERIQUES



## COMPORTEMENT DE LA CHLORMÉRODRINE VIS-A-VIS DE L'ELECTROPHORESE ET DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE

Avant d'étudier le transport de la Chlormérodrene par les protéines sériques, nous avons cherché à connaître son comportement vis-à-vis des méthodes que nous allons utiliser.

### A - Migration électrophorétique de la Chlormérodrene

Dans un champ électrique, en présence de tampon alcalin la Chlormérodrene migre ainsi que les protéines de la cathode vers l'anode. Nous avons étudié l'action des différents tampons que nous avons utilisé au cours de notre étude, ainsi que l'influence possible des différents supports.

#### 1 - Electrophorèse sur acétate de cellulose humide

##### - Technique

A l'extrémité cathodique de bandes de Cellogel on dépose 1  $\mu$ l des solutions suivantes de Chlormérodrene :

- sur la première bande : 1  $\mu$ l de la solution mère de Chlormérodrene
- sur la deuxième bande : 1  $\mu$ l de cette solution diluée au 1/10ème
- sur la troisième bande : 1  $\mu$ l de la solution mère diluée au 1/100ème

La conduite de l'électrophorèse et la préparation des autoradiographies sont effectuées selon la technique indiquée dans le Chapitre V.

##### - Résultats

Ces différentes solutions de Chlormérodrene migrent toutes de la même façon pour un même tampon.

Pour les deux tampons que nous avons utilisé : le tampon universel de MICHAELIS et le tampon véronal-véronal sodique, nous avons constaté que la Chlormérodrene, comme le MHP migrerait à un niveau inférieur à celui des  $\gamma$  globulines.

## 2 - Electrophorèse sur acétate de cellulose sec

En reproduisant la même technique que pour le Cellogel, nous retrouvons la Chlormérodrene au même niveau par rapport au dépôt.

## 3 - Electrophorèse sur papier

La migration électrophorétique de la Chlormérodrene ne présente pas de modification par rapport au résultat obtenu sur acétate de cellulose.

Lors de notre étude de la fixation de Chlormérodrene aux protéines sériques par la technique d'électrophorèse, nous retrouverons le composé mercuriel au même niveau que le MHP par rapport aux  $\gamma$  globulines.

## B - Etude de la Chlormérodrene sur Séphadex G. 200

Ainsi que le MHP, la Chlormérodrene est une molécule trop petite par rapport à la limite inférieure de rétention du G. 200 et a peu de chance d'être retenue. D'autre part, les solutions de Chlormérodrene ont une densité identique à celle des éluants, nous aurons donc une répartition homogène du composé mercuriel dans le séphadex, ce qui entraînera une sortie égale dans les éluats.

## - Conclusion

Nous ne pourrions par chromatographie sur colonne repérer en un seul pic la présence de Chlormérodrene libre.

## ETUDE IN VITRO DE LA LIAISON DE LA CHLORMERODRINE AUX PROTEINES SERIQUES

De la même façon que pour le MHP, nous nous proposons de mettre en évidence une éventuelle liaison de ce composé organo-mercuriel avec les protéines sériques Humaines et de Lapin en utilisant les techniques de séparation des protéines que nous avons décrites au Chapitre V.

### - Principe

La Chlormérodrene est mise en contact de sérum dans des conditions parfaitement définies. Dans le but de mettre en évidence le comportement de ce composé mercuriel vis-à-vis des protéines sériques, nous fractionnons le mélange sérique par les techniques suivantes : électrophorèse, chromatographie et immuno-électrophorèse. Nous complétons notre étude par la technique de dialyse.

### A - Dialyse

Afin de savoir si le composé mercuriel se fixait aux protéines sériques in vitro dans des conditions les plus voisines possibles des conditions physiologiques, nous avons étudié la fixation de la Chlormérodrene aux protéines par dialyse contre une solution tampon millimolaire de pH = 7,4.

### - Technique

La technique utilisée est strictement la même que celle qui nous a permis l'étude par dialyse du MHP.

L'expérience a été faite avec les mêmes taux de mercure pour 1 g de protéines soit : 5 µg, 50 µg et 100 µg.

- Résultats

Les résultats ont été rassemblés dans le tableau XXI et nous permettent de constater que la Chlormérodrine in vitro, dans des conditions voisines des conditions physiologiques se fixe aux protéines sériques.

TABLEAU XXI

Etude par dialyse de la fixation de la  
Chlormérodrine aux protéines sériques Humaines

| Temps         | 5 $\mu$ g de Hg<br>/ 1 g de protéines<br>= 24 800 cpm | 50 $\mu$ g de Hg<br>/ 1 g de protéines<br>= 243 000 cpm | 100 $\mu$ g de Hg<br>/ 1 g de protéines<br>= 490 000 cpm |
|---------------|-------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Bruit de fond | 63                                                    | 59                                                      | 65                                                       |
| 16 heures     | 60                                                    | 10 900                                                  | 20 700                                                   |
| 24 heures     | 62                                                    | 11 400                                                  | 21 100                                                   |
| 40 heures     | 5 300                                                 | 130 000                                                 | 160 000                                                  |
| 4 jours       | 24 700                                                | 228 000                                                 | 487 000                                                  |

La Chlormérodrine se comporte vis-à-vis des protéines de la même façon que le MHP . En effet, pour la dose de 5  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines, nous pouvons observer une fixation totale du composé mercuriel par les protéines non dénaturées. A partir de 50  $\mu$ g de Hg, il apparaît une saturation des protéines, qui s'accroît avec la quantité de mercure. Nous pouvons noter que cette saturation est proportionnelle à la quantité de mercure pour un taux défini de protéines.

Une expérience identique a été faite avec du sérum de Lapin et nous a donné les mêmes résultats de fixation totale du mercure pour la dose de 5  $\mu$ g de Hg par g de protéines et de saturation de la liaison composé mercuriel-protéines à partir de 50  $\mu$ g de Hg pour le même taux de protéines.

B - Electrophorèse

L'étude de la liaison des protéines sériques de Lapin et d'Homme avec la Chlormérodrine a été conduite suivant le même plan adopté pour le MHP.

Les essais d'électrophorèse ont été effectués :

- 1) Sur des supports différents : Cellogel, acétate de cellulose sec et papier afin de vérifier l'action possible du support sur la liaison entre la Chlormérodrine et les protéines.

- 2) Avec des tampons différents dans le but de vérifier de même leur action possible sur la liaison Chlormérodrene-protéines.
- 3) Avec deux sérums différents (Homme et Lapin) car les protéines de ces deux sérums n'ont pas strictement la même structure et l'on peut penser que la fixation de la Chlormérodrene serait modifiée.

1 - Etude de la liaison protéine - Chlormérodrene par migration électrophorétique sur Cellogel

De même que pour le MHP, nous avons vérifié pour la Chlormérodrene que ni le temps de contact entre le composé-mercuriel et les protéines sériques, ni la température à laquelle nous préparions le mélange avant la migration électrophorétique n'intervenaient sur la qualité des résultats obtenus.

Alors que le MHP dilué au  $\frac{1}{100}$  nous donnait une fixation plus nette que la solution mère (figure 22), les différentes dilutions de la Chlormérodrene ne semblent pas fournir de résultats meilleurs.

Pour toutes nos expériences, nous avons adopté le protocole opératoire suivant : mise en contact pendant 5 mn à 37° avec agitation du sérum frais ou vieux de 24 heures après conservations à 4° avec le composé mercuriel dilué ou non.

Dans un premier temps, nous avons étudié la fixation aux protéines de quantités croissantes de Chlormérodrene.

Dans un deuxième temps, nous avons complété notre étude par l'action des différents tampons que nous avons utilisé précédemment.

1.1 - Etude de la fixation de la Chlormérodrene aux protéines à différentes concentrations de Hg ramenées à 1 g de protéines, en utilisant pour tampon d'électrophorèse, le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et de  $\frac{I}{2} = 0,1$

La concentration en mercure des solutions de Chlormérodrene a été calculée par le rapport de l'activité spécifique (nombre de mCi/mg de mercure) et de l'activité volumique (nombre de mCi/ml de solution).

La concentration en protéines par ml de sérum est évaluée par densitométrie à 280 mμ à partir de la courbe illustrée par la figure 10, reliant la densité optique à la teneur en protides.

- Résultats

Nous avons rassemblé dans les tableaux XXII et XXIII les résultats obtenus.

Dans le cas de la Chlormérodrene, nous observons une fixation par les protéines sériques variant d'une expérience à une autre, alors que le protocole opératoire est strictement le même. Au cours de la migration électrophorétique faite avec le tampon de MICHAELIS de  $\text{pH} = 8,6$  et de  $\frac{\Gamma}{2} = 0,1$  nous obtenons pour la dose de  $1 \mu\text{g}$  de Hg par g de protéines, parfois une fixation uniquement au niveau des  $\alpha$  globulines (tableau XXII), parfois une fixation uniquement au niveau des albumines (figure 32 et tableau XXIII).

TABLEAU XXII

Fixation de la Chlormérodrene par les protéines sériques à différentes concentrations de Hg. Etude faite avec le tampon de MICHAELIS de  $\text{pH} = 8,6$

| Quantité de Hg/1 g<br>de protéines | Fractions protéiques |          |         |          |     |
|------------------------------------|----------------------|----------|---------|----------|-----|
|                                    | Dépôt                | $\gamma$ | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| 1 $\mu\text{g}$                    |                      |          |         | +        |     |
| 5 $\mu\text{g}$                    |                      |          |         | +        |     |
| 10 $\mu\text{g}$                   |                      |          |         | +        |     |
| 50 $\mu\text{g}$                   | +                    | +        |         | ++       |     |
| 100 $\mu\text{g}$                  | +                    | +        | +       | ++       | +   |

TABLEAU XXIII

Mêmes expériences que dans le tableau XXII mais avec une solution  
différente de Chlormérodrene

| Quantité de Hg/1 g<br>de protéines | Fractions protéiques |          |         |          |     |
|------------------------------------|----------------------|----------|---------|----------|-----|
|                                    | Dépôt                | $\gamma$ | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| 1 $\mu\text{g}$                    |                      |          |         |          | +   |
| 5 $\mu\text{g}$                    |                      |          |         |          | +   |
| 10 $\mu\text{g}$                   |                      |          |         | +        | +   |
| 50 $\mu\text{g}$                   | +                    | +        | +       | +        | ++  |
| 100 $\mu\text{g}$                  | +                    | +        | +       | +        | ++  |

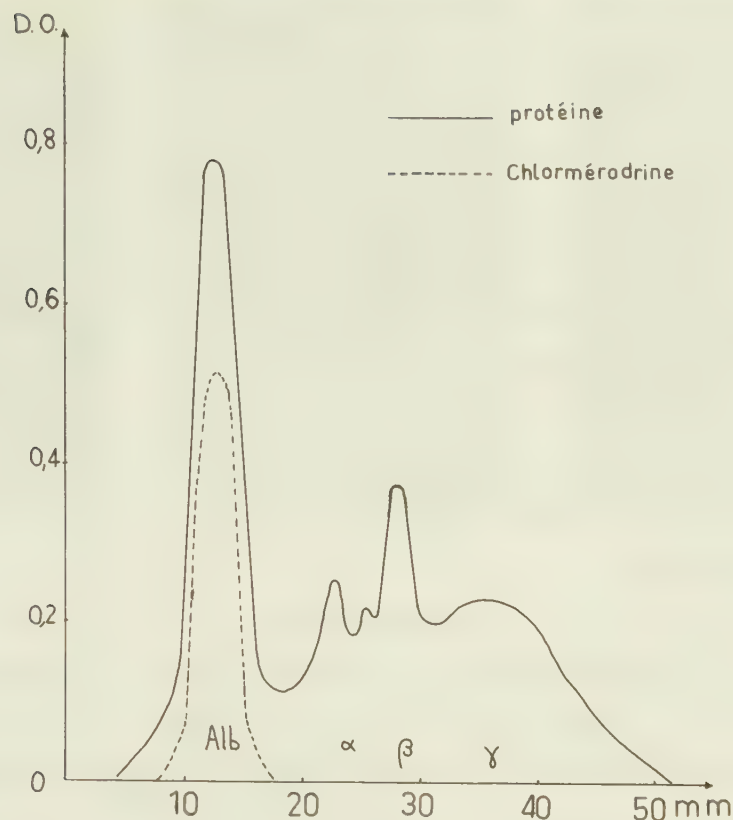


Figure 32 - Fixation de la Chlormérodrene par l'albumine. Migration électrophorétique faite avec le tampon de MICHAELIS.

Si nous augmentons la dose de Chlormérodrene, les protéines fixent le mercure de façon identique au MHP. C'est-à-dire que l'inhibition de la liaison au niveau de l'albumine lorsqu'elle se produit, persiste jusqu'à une dose suffisamment élevée de mercure. La trace observée à 1  $\mu$ g de Hg reste à peu près la même jusqu'à 100  $\mu$ g de Hg. Par contre, si nous observons une liaison entre l'albumine et le composé mercuriel, elle persistera quelle que soit la concentration en Chlormérodrene en même temps que nous observons une liaison des autres protéines.

La Chlormérodrene comme le MHP migre seule à un niveau assez voisin des  $\gamma$  globulines. Aussi pouvons-nous confondre sur l'autoradiographie le transfert du composé mercuriel par les  $\gamma$  globulines et la migration électrophorétique de la Chlormérodrene libre.

#### 1.2 - Etude de la liaison entre les protéines sériques et la Chlormérodrene en utilisant différents tampons d'électrophorèse

Les différents tampons utilisés sont :

- les tampons universels type MICHAELIS de pH variant de la valeur de 9,5 à 7,4 et de force ionique voisine de 0,1

- le tampon véronal-véronal sodique de pH = 8,6 et de  $\frac{\Gamma}{2} = 0,07$
- le tampon ARONSSON et GRONWALL de pH = 8,9 et de  $\frac{\Gamma}{2} = 0,08$ .

Leur composition a été donnée dans le Chapitre V.

De même que pour le MHP, l'étude de l'influence de ces différents tampons sur le transport de la Chlormérodrene par les protéines au cours de la migration électrophorétique a été faite avec 1 µg de Hg pour 1 g de protéines. Pour le tampon véronal nous avons cependant étudié l'action des doses croissantes de Hg.

- Résultats

Dans le tableau XXIV nous avons réuni les résultats de l'action de différents tampons sur la liaison protéines-MHP.

TABLEAU XXIV

Etude des différents tampons sur la liaison protéines-Chlormérodrene  
Support d'électrophorèse : Cellogel

| Tampon                                           |          | Fractions protéiques |   |   |       |
|--------------------------------------------------|----------|----------------------|---|---|-------|
|                                                  |          | Dépôt                | γ | β | α Alb |
| Tampon de MICHAELIS<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,1$  | pH = 9   |                      |   |   | +     |
|                                                  | pH = 8,6 |                      |   |   | +     |
|                                                  | pH = 8,6 |                      |   |   | +     |
|                                                  | pH = 8,4 |                      |   |   | +     |
|                                                  | pH = 8,2 |                      |   |   | +     |
|                                                  | pH = 8   |                      |   |   | +     |
|                                                  | pH = 7,4 |                      |   |   | +     |
| Tampon de MICHAELIS<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,07$ |          |                      |   |   | +     |
| pH = 8,6                                         |          |                      |   |   |       |
| Tampon Véronal<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,075$     |          |                      |   |   | +     |
| pH = 8,6                                         |          |                      |   |   |       |
| Tampon Tris<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,08$         |          |                      |   |   | +     |
| pH = 8,8                                         |          |                      |   |   |       |

Comme nous l'avions observé dans les tableaux XXII et XXIII le transport de la Chlormérodrene par les protéines peut être modifié.

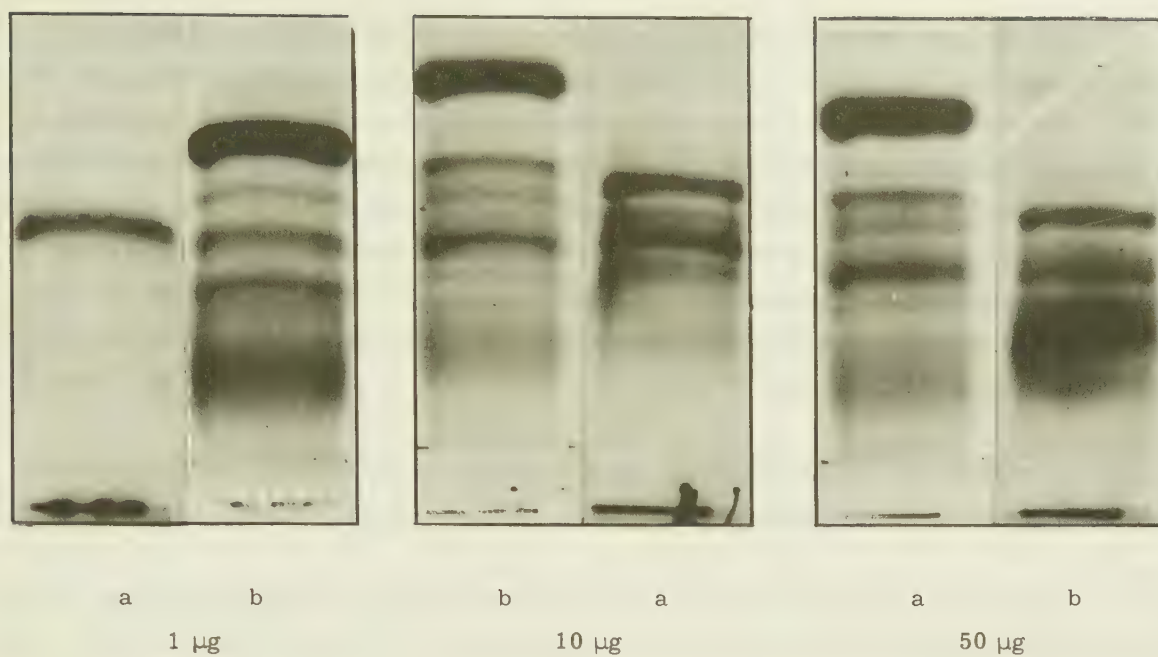


Figure 33 - Fixation de doses croissantes de Chlormérodine par les protéines de sérum humain.  
Migration électrophorétique faite avec le tampon de MICHAELIS.

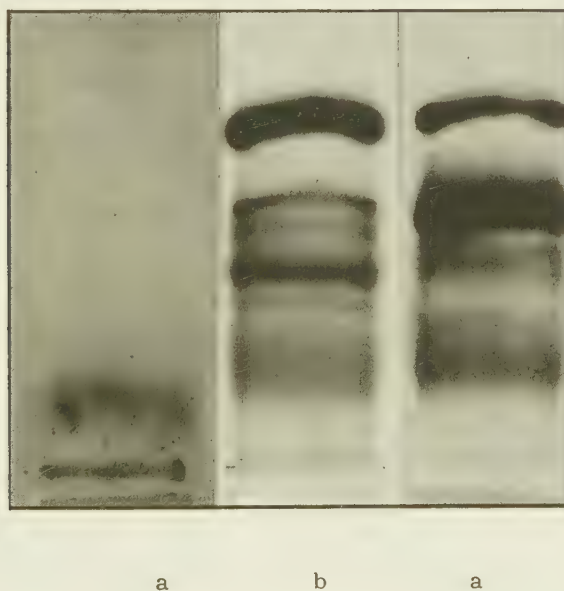


Figure 34 - Fixation de 20 µg de mercure sous la forme de Chlormérodine par du sérum humain.  
Migration électrophorétique faite avec du tampon de MICHAELIS.

a : autoradiographie  
b : électrophorégramme

Nous pouvons avoir une fixation soit sur l'albumine, soit sur les  $\alpha$  globulines. Les variations du tampon de MICHAELIS, l'utilisation du tampon véronal-véronal sodique et du tampon Tris-EDTA nous permettent de constater que ce phénomène de compétition entre l'albumine et les  $\alpha$ -globulines ne se produit que dans le cas du tampon de MICHAELIS et dans une certaine zone de pH de celui-ci. Au pH du sérum lui-même pH = 7,4, nous obtenons avec le tampon de MICHAELIS de même pH une fixation de la Chlormérodrene sur l'albumine. Si nous modifions le pH de ce même tampon, nous observons que dans la zone de pH comprise entre pH = 8,8 et pH = 8,2 le composé mercuriel ne se fixe que sur les  $\alpha$  globulines. Cette zone de pH est la même que celle observée dans le cas du MHP (figures 33 et 34).

Le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et de  $\frac{\Gamma}{2} = 0,07$  offre la même fixation de la Chlormérodrene sur les  $\alpha$  globulines.

1.3 - L'étude de la fixation de doses croissantes de Chlormérodrene aux protéines sériques dans le cas d'une migration électrophorétique faite en présence de tampon véronal-véronal sodique montre des résultats identiques à l'étude faite avec le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 offrant une liaison entre le composé-mercuriel et l'albumine. Aux doses les plus faibles la Chlormérodrene se fixe préférentiellement aux albumines, puis sur les  $\alpha$  globulines et en continuant d'augmenter la dose sur les  $\gamma$  globulines et enfin sur les  $\beta$  globulines avant de trouver du composé mercuriel libre (figure 35).

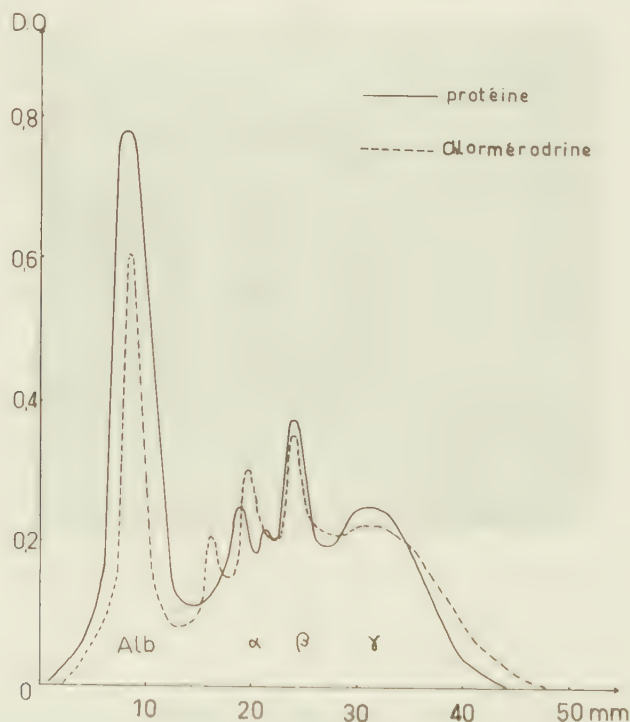


Figure 35 - Fixation de la Chlormérodrene par toutes les fractions protéiques. Migration électrophorétique faite avec le tampon véronal-véronal sodique.

2 - Etude de la liaison protéines-Chlormérodrene par migration électrophorétique sur acétate de cellulose gelatineuse sec

La technique d'électrophorèse, la préparation des autoradiographies et des électrophorégrammes sont ceux que nous avons décrits dans le Chapitre V.

Nous avons gardé le même protocole opératoire que celui établi par le Cellogel. C'est-à-dire : Mise en contact pendant 5 mn à 37° avec agitation du sérum frais et du composé mercuriel.

L'étude de l'action des différents tampons d'électrophorèse a été faite avec les tampons cités précédemment et une concentration de 1 µg de mercure par gramme de protéines.

- Résultats

Pour la Chlormérodrene nous avons observé strictement les mêmes résultats que le MHP (tableau XXV), avec une fixation par les α globulines pour le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et une fixation par l'albumine dans tous les autres cas.

TABLEAU XXV

Influence de différents tampons sur la liaison protéines-Chlormérodrene  
Support d'électrophorèse : acétate de cellulose sec

| Tampon                                           |          | Fractions protéiques |   |   |       |
|--------------------------------------------------|----------|----------------------|---|---|-------|
|                                                  |          | Dépôt                | γ | β | α Alb |
| Tampons de MICHAELIS<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,1$ | pH = 9   |                      |   |   | +     |
|                                                  | pH = 8,6 |                      |   |   | +     |
|                                                  | pH = 7,4 |                      |   |   | +     |
| Tampon Véronal                                   | pH = 8,6 |                      |   |   | +     |
| Tampon Tris-EDTA                                 | pH = 8,8 |                      |   |   | +     |

3 - Etude de la liaison protéines-Chlormérodrene par migration électrophorétique sur support de papier

Les conditions d'études sur support de papier ont été indiquées dans la technique d'électrophorèse sur papier Chapitre V.

Le protocole opératoire de la mise en contact du sérum et du composé mercuriel est le même que pour les deux supports d'acétate de cellulose.

La concentration en mercure pour un gramme de protéines est de 1 µg au cours de l'étude de l'influence des différents tampons déjà cités dans l'étude de leur action sur la liaison entre les protéines et la Chlormérodrene par migration électrophorétique sur acétate de cellulose gélatineuse.

- Résultats

Nous retrouvons dans le tableau XXVI exactement les mêmes résultats que dans le cas des supports d'acétate de cellulose.

TABLEAU XXVI

Etude de l'influence de différents tampons sur la liaison Chlormérodrene-  
protéines au cours de la migration électrophorétique sur papier

| Tampon                                             | Fractions protéiques           |   |   |   |     |
|----------------------------------------------------|--------------------------------|---|---|---|-----|
|                                                    | Dépôt                          | γ | β | α | Alb |
| Tampon de<br>MICHAELIS<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,1$ | pH = 9<br>pH = 8,6<br>pH = 7,4 |   |   |   | +   |
|                                                    |                                |   |   | + | +   |
| Tampon Véronal<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,075$       | pH = 8,6                       |   |   |   | +   |
| Tampon Tris-EDTA<br>$\frac{\Gamma}{2} = 0,08$      | pH = 8,8                       |   |   |   | +   |

C - Chromatographie sur colonne de Séphadex

- Technique

Pour étudier par chromatographie sur colonne de Séphadex, la fixation de la Chlor-mérodrene aux protéines sériques, nous avons utilisé la technique développée dans le Chapitre V et suivie pour l'étude de la fixation du MHP.

Les essais ont été effectués avec le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et le tampon recommandé par KILLANDER.

Afin de pouvoir détecter la radioactivité par comptage dans un scintillateur à cristal creux, nous avons adopté la dose de 20  $\mu\text{g}$  de  $^{203}\text{Hg}$  pour 1 g de protéines.

La préparation du mélange de sérum et de Chlormérodine est faite suivant le protocole opératoire choisi pour la migration électrophorétique.

De même que pour le MHP les expériences ont été faites avec du sérum humain et du sérum de Lapin préparés selon le processus indiqué dans le Chapitre V et dont le taux de protéines est mesuré par densitométrie à 280 m $\mu$  (figure 10).

Après séparation des protéines par chromatographie, les éluats correspondants aux sommets des trois fractions protéiques obtenues sont soumis à la lyophilisation. La poudre ainsi obtenue, remise en solution dans le tampon choisi comme éluant, est soumise à une électrophorèse sur Cellogel et la radioactivité est localisée par autoradiographie. Les électrophorèses sur Cellogel sont faites avec le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et le tampon véronal-véronal sodique.

#### - Résultats

Dans le Chapitre VI, nous avons montré que la chromatographie sur Séphadex G. 200 nous permettait d'obtenir trois groupes de protéines que nous avons caractérisé comme étant :

- la première fraction, les  $\beta$  globulines,
- la deuxième fraction, les  $\gamma$  globulines et quelques  $\alpha$  globulines,
- la troisième fraction, les albumines et le reste des  $\alpha$  globulines.

#### a) Résultats de la fixation de la Chlormérodine aux protéines par chromatographie sur Séphadex

Les résultats fournis par la Chlormérodine sont en tous points superposables à ceux obtenus pour le MHP. La courbe de la concentration radioactive nous permet de voir qu'à la dose de 20  $\mu\text{g}$  de Hg pour 1 g de protéines, la Chlormérodine est fixée par les  $\gamma$  globulines et par le groupe formé des  $\alpha$  globulines et de l'albumine. Toute la Chlormérodine semble s'être fixée aux protéines car nous n'avons pu déceler de radioactivité dans l'éluat ni avant les premières protéines, ni après les dernières.

Nous n'avons pas observé de modification dans la fixation du composé mercuriel par les protéines après passage sur Séphadex G. 200 avec le tampon de MICHAELIS ou le tampon de KILLANDER.

b) Résultats de la fixation de la Chlormérodrene aux protéines après migration électrophorétique des trois fractions protéiques

Les autoradiographies des électrophorèses faites à partir des lyophilisats des trois fractions protéiques obtenues après la séparation chromatographique sur Séphadex G, 200 nous ont permis de constater que la Chlormérodrene se comportait de façon identique au MHP (tableau XXVII).

TABLEAU XXVII

Fixation de la Chlormérodrene sur les fractions protéiques obtenues par chromatographie et soumises à l'électrophorèse

| Eluant              | Tampon d'électrophorèse | Fractions protéiques |         |          |     |
|---------------------|-------------------------|----------------------|---------|----------|-----|
|                     |                         | $\gamma$             | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| Tampon de MICHAELIS | Véronal                 | +                    |         |          | +   |
|                     | Michaelis               | +                    |         | +        |     |
| Tampon de KILLANDER | Véronal                 | +                    |         |          | +   |
|                     | Michaelis               | +                    |         | +        |     |

Quel que soit le tampon utilisé pour éluant, si la migration électrophorétique est faite avec le tampon véronal-véronal sodique, la Chlormérodrene se trouve fixée par l'albumine et les  $\alpha$  globulines. Si la migration électrophorétique est faite en présence de tampon de MICHAELIS de pH = 8,6, la Chlormérodrene se trouve fixée au niveau des  $\alpha$  globulines et des  $\gamma$  globulines.

D - Etude de la liaison protéines-Chlormérodrene par la méthode de la radio-immuno-électrophorèse

Nous avons étudié la liaison protéique-Chlormérodrene par radio-immuno-électrophorèse selon le mode opératoire développé au Chapitre V.

De même que pour l'étude de la liaison protéine-MHP, nous avons opéré avec deux tampons différents : le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et le tampon véronal sodique de pH = 8, cité dans le mode opératoire.

La quantité de mercure par g de protéines a dû être augmentée car nous ne détectons par autoradiographie que la radioactivité des protéines précipitées, toutes les autres pro-

téines ayant été éliminées par le rinçage des plaques. Pour le  $^{203}\text{Hg}$  nous n'avons pu déceler moins de 10  $\mu\text{g}$  de Hg par g de protéines.

Les essais ont été effectués avec du sérum Humain et du sérum de Lapin préparés selon le protocole opératoire (Chapitre V).

Les mélanges de sérum et de composé mercuriel ont été faits en mettant en contact 5 mn à 37° sous agitation, avant le dépôt dans les réservoirs des plaques.

#### - Résultats -----

Les résultats acquis sont strictement superposables à ceux obtenus avec le MHP.

## ACTION DE L'ALBUMINE ET DES GLOBULINES HUMAINES SUR LA CHLORMÉRODRINE

Pour la Chlormérodrine, nous avons observé, comme pour le MHP que l'albumine et les  $\alpha$  globulines avaient un rôle important dans le transport de ce composé mercuriel. En effet, à des doses voisines de 1  $\mu$ g de mercure par g de protéines, la radioactivité se situait sur les unes ou les autres selon les conditions de migration électrophorétique.

Nous avons cherché à étudier la liaison de la Chlormérodrine avec de l'albumine humaine pure et avec un mélange d'albumine et d' $\alpha$  globulines dans les proportions de 98 % et de 2 %. Cette étude a été faite uniquement par électrophorèse sur Cellogel en présence de tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et de tampon véronal-véronal sodique de même pH, car ce n'est qu'au cours de la migration électrophorétique que nous avons observé ce phénomène de compétition vis-à-vis de la fixation de la Chlormérodrine, entre l'albumine et les  $\alpha$  globulines.

### - Technique

La technique suivie pour cette étude est strictement la même que celle utilisée pour l'étude de la liaison du MHP par l'albumine pure. Il en est de même pour la technique d'électrophorèse, la préparation des autoradiographies et des électrophorégrammes.

### - Résultats

#### 1 - Résultats obtenus avec le tampon de MICHAELIS

En présence de tampon de MICHAELIS et à la dose de 1  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines, nous avons pu calculer, comme pour le MHP, que l'albumine pure et l'albumine mélangée à des  $\alpha$  globulines fixaient environ 54 % de la quantité de Chlormérodrine restée sur l'autoradiographie. Dans le cas de l'albumine pure, nous trouvons au niveau de l'endroit où la Chlormérodrine migre le même pourcentage de radioactivité 33 % que dans le cas du MHP. Dans le cas de l'albumine en présence des  $\alpha$  globulines, ces mêmes 33 % se situent au niveau des  $\alpha$  globulines, et nous ne discernons aucune trace de Chlormérodrine libre.

2 - Résultats obtenus avec le tampon véronal

Les mêmes résultats sont obtenus avec la Chlormérodrene et le MHP dans cette dernière étude. Que l'albumine soit pure ou en présence d' $\alpha$  globulines, pour la dose de 1  $\mu$ g de Hg, nous retrouvons toute la radioactivité au niveau de l'albumine.

Nous avons rassemblé les résultats obtenus pour la Chlormérodrene dans les tableaux XXVIII et XXIX.

TABLEAU XXVIII

Fixation de la Chlormérodrene par l'albumine pure

| Tampon       | % d'activité |                      |
|--------------|--------------|----------------------|
|              | Alb          | Chlormérodrene libre |
| de MICHAELIS | 54 %.        | 33 %.                |
| Véronal      | 99 %.        |                      |

TABLEAU XXIX

Fixation de la Chlormérodrene par le mélange albumine, globulines

| Tampon       | % d'activité |          |                      |
|--------------|--------------|----------|----------------------|
|              | Alb          | $\alpha$ | Chlormérodrene libre |
| de MICHAELIS | 54 %.        | 33 %.    |                      |
| Véronal      | 98 %.        |          |                      |

## - CONCLUSION

A l'aide des différentes techniques que nous avons utilisé, nous avons pu constater que la Chlormérodrene était fixée par les protéines sériques de façon identique au MHP.

A des doses suffisamment faibles, voisines de 1  $\mu$ g de Hg par g de protéines, la Chlormérodrene se trouve dans le cas général fixée par l'albumine et dans le cas particulier de 1 a la migration électrophorétique en présence de tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 par les  $\alpha$  globulines. Il est arrivé, même en présence de tampon de MICHAELIS à pH = 8,6 que nous obtenions une fixation de la Chlormérodrene sur les albumines. Nous avons attribué ces modifications de fixation à une décomposition du composé mercuriel avant sa mise en contact avec le sérum, comme dans le cas du MHP.

A l'exception du cas particulier du tampon de MICHAELIS nous avons pu observer lorsque nous augmentons les quantités de Chlormérodrene par rapport aux taux de protéines que celles-ci se saturaient de composé mercuriel les unes après les autres, les albumines les premières, puis les  $\alpha$  globulines, les  $\gamma$  globulines et enfin les  $\beta$  globulines.

La chromatographie sur colonne nous a permis de confirmer que les traces de radioactivité retrouvées au niveau des  $\gamma$  globulines sur les autoradiographies étaient bien dues à la fixation de la Chlormérodrene par ces protéines et ne résultaient pas de la migration du produit non fixé.

La reprise des éluats de la chromatographie en vue d'une électrophorèse nous a confirmé que la fixation de la Chlormérodrene par les  $\alpha$  globulines au cours de la migration électrophorétique en présence de tampon de MICHAELIS était bien un phénomène ne se reproduisant que sous l'effet du courant d'électrophorèse. Nous essayerons de nous en expliquer au cours de notre discussion.

La technique d'immunoélectrophorèse nous a permis de connaître plus en détail que par la méthode d'électrophorèse, à quelles protéines exactement le composé mercuriel était fixé.

CHAPITRE VIII

---

ETUDE DE LA FIXATION DU MERCURE IONIQUE PAR LES  
PROTEINES SERIQUES ET DU MHP PAR LES ACIDES AMINES



## ETUDE DE LA FIXATION DU CHLORURE MERCURIQUE ET DE L'ACETATE MERCURIQUE PAR LES PROTEINES SERIQUES

Dans les deux chapitres précédents nous avons étudié la fixation de deux composés organo-mercuriels, le MHP et la Chlormérodine par les protéines sériques. Nous avons observé au cours de cette étude que les composés mercuriels étaient fixés de façon nette et sélective par les protéines. En effet, sur les autoradiographies des électrophorèses et des immuno-électrophorèses, nous retrouvions des bandes et des arcs de radioactivité bien séparés les uns des autres. D'autre part, nous avons observé qu'au cours de la migration électrophorétique en présence de tampon de MICHAELIS de pH voisin de 8,6 nous avons une modification dans la fixation des composés mercuriels par les protéines. Nous avons voulu étudier dans le présent chapitre la fixation par les protéines sériques de composés mercuriels plus ionisables que le MHP et la Chlormérodine, le chlorure mercurique et l'acétate mercurique tous deux marqués au  $^{197}\text{Hg}$ . Nous avons choisi ces deux composés car le premier est très utilisé en médecine nucléaire et le second entre dans les synthèses de préparation du MHP et de la Chlormérodine.

Au cours de cette étude sur la fixation par les protéines sériques du chlorure mercurique et de l'acétate mercurique, nous étudierons dans un premier temps le comportement de ces deux sels de mercure en électrophorèse, dans un deuxième temps nous analyserons leur fixation par les protéines sériques Humaines et de Lapin en utilisant la technique de dialyse, celle d'électrophorèse et celle d'immuno-électrophorèse.

### A - Comportement du chlorure mercurique et de l'acétate mercurique en migration électrophorétique.

Avant d'étudier le transport par les protéines sériques de ces deux composés mercuriels nous avons cherché à connaître leur comportement vis-à-vis de la méthode d'électrophorèse sur support de Cellogel et de papier. Pour chaque support d'électrophorèse, nous avons utilisé le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et le tampon véronal-véronal sodique.

## - Technique

Pour nous placer dans les mêmes conditions générales de migration électrophorétique, nous avons déposé à l'extrémité cathodique des bandes d'électrophorèse 1  $\mu$ l des solutions mères de chlorure mercurique et d'acétate mercurique ainsi que des dilutions au  $\frac{1}{10}$  et au  $\frac{1}{100}$  de ces mêmes solutions. La conduite de l'électrophorèse sur Cellogel et sur papier ainsi que la préparation des autoradiographies sont effectués selon les techniques indiquées dans le Chapitre V.

## - Résultats

Les différentes solutions de chlorure mercurique et d'acétate mercurique migrent toutes de la même façon quelles que soient la composition du tampon et la nature du support électrophorétique.

Alors que pour le MHP et la Chlormérodrene, nous avons observé que la distance de migration de ces composés ne dépendait pas de la concentration en mercure et que la tâche de radioactivité observée sur l'autoradiographie était presque intégralement indépendante du dépôt (figure 36), pour le chlorure mercurique et l'acétate mercurique il n'en est pas de même. En effet, ces deux composés mercuriels présentent une migration continue depuis le dépôt et de plus cette migration est d'autant plus éloignée que la concentration en mercure du produit déposé est plus grande.

Sur la figure 36, nous pouvons voir que les solutions mères de chlorure mercurique et d'acétate mercurique ont migré au-delà de l'emplacement des albumines, beaucoup plus loin que les solutions cent fois moins concentrées qui n'ont migré qu'au niveau des  $\gamma$  globulines.

De ce fait, dans notre étude de la fixation de ces deux composés mercuriels aux protéines sériques par la technique d'électrophorèse, nous obtiendrons des autoradiographies beaucoup moins nettes que celles obtenues avec le MHP et la Chlormérodrene si le chlorure mercurique ou l'acétate mercurique ne sont pas intégralement fixés par les protéines.

## B - Etude in vitro de la fixation du chlorure mercurique et de l'acétate mercurique par les protéines sériques

De même que pour le MHP et la Chlormérodrene, nous nous proposons de mettre en évidence une éventuelle liaison de ces deux composés mercuriels avec les protéines sériques Humaines et de Lapin en utilisant les techniques suivantes : dialyse, électrophorèse, immuno-électrophorèse que nous avons décrites au Chapitre V.

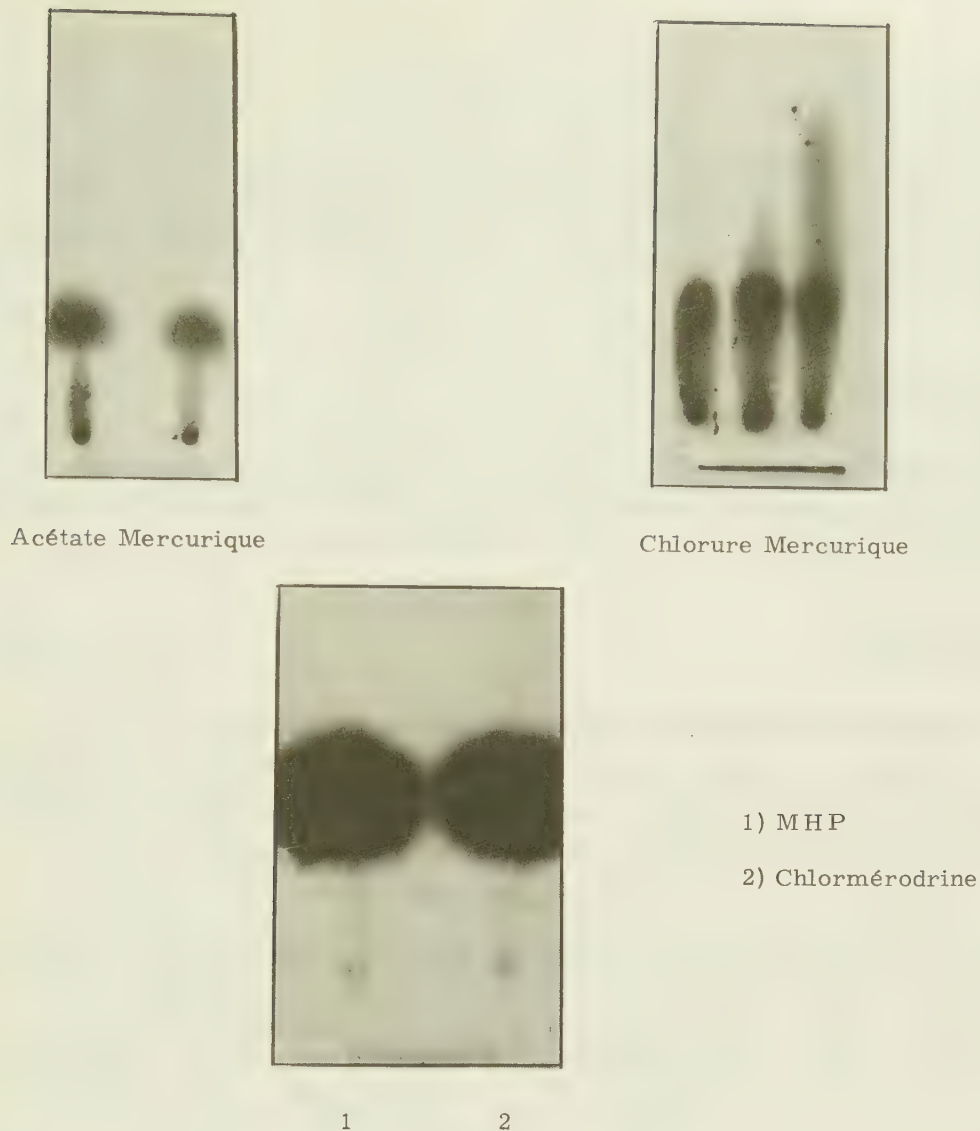


Figure 36 - Autoradiographies de la migration des composés mercuriels en l'absence de sérum. Emploi du tampon de MICHAELIS.

- Principe

Dans les conditions parfaitement définies le chlorure mercurique et l'acétate mercurique sont mis en contact avec du sérum. Le comportement de ces deux composés mercuriels vis-à-vis des protéines sériques est mis en évidence par le fractionnement du mélange sérique à l'aide des techniques déjà citées.

## 1 - Dialyse

Dans le but de savoir si ces composés mercuriels étaient fixés par les protéines sériques in vitro dans des conditions les plus voisines possibles des conditions physiologiques, nous avons voulu étudier cette fixation par dialyse contre une solution tampon millimolaire de véronal et véronal sodique de pH = 7,4.

### - Technique

La technique utilisée est la même que celle qui nous a permis l'étude par dialyse du MHP et de la Chlormérodrene. L'expérience a été faite avec des taux de 1  $\mu$ g, 5  $\mu$ g et 50  $\mu$ g de mercure par g de protéines.

### - Résultats

Les résultats ont été rassemblés dans les tableaux XXX et XXXI et nous ont permis de constater que même à la dose de 1  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines tout le composé mercuriel n'est pas fixé par les protéines dans des conditions voisines des conditions physiologiques.

TABLÉAU XXX

Etude par dialyse de la fixation du chlorure mercurique par les protéines sériques

| Temps         | 1 $\mu$ g de Hg pour 1 g<br>de protéines<br>= 18 700 cpm | 5 $\mu$ g de Hg pour 1 g<br>de protéines<br>= 93 000 cpm | 50 $\mu$ g de Hg pour 1 g<br>de protéines<br>= 942 000 cpm |
|---------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Bruit de fond | 58 cpm                                                   | 65 cpm                                                   | 62 cpm                                                     |
| 16 heures     | 2 300 "                                                  | 12 600 "                                                 | 98 700 "                                                   |
| 24 heures     | 2 100 "                                                  | 12 800 "                                                 | 98 600 "                                                   |
| 40 heures     | 8 900 "                                                  | 46 500 "                                                 | 454 000 "                                                  |
| 4 jours       | 18 200 "                                                 | 91 000 "                                                 | 960 000 "                                                  |

Ces expériences faites sur du sérum de Lapin et sur du sérum Humain ont présenté les mêmes résultats de non fixation totale du chlorure mercurique et de l'acétate mercurique à la plus faible dose que nous ayons utilisée, soit 1  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines.

TABLEAU XXXI

Etude par dialyse de la fixation de l'acétate mercurique par les protéines sériques

| Temps         | 1 $\mu$ g de Hg pour 1 g<br>de protéines<br>= 15 800 cpm | 5 $\mu$ g de Hg pour 1 g<br>de protéines<br>= 79 800 cpm | 50 $\mu$ g de Hg pour 1 g<br>de protéines<br>= 787 600 cpm |
|---------------|----------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| Bruit de fond | 62 cpm                                                   | 58 cpm                                                   | 59 cpm                                                     |
| 16 heures     | 2 100 "                                                  | 10 800 "                                                 | 53 700 "                                                   |
| 24 heures     | 2 000 "                                                  | 10 800 "                                                 | 53 800 "                                                   |
| 40 heures     | 9 700 "                                                  | 48 700 "                                                 | 463 000 "                                                  |
| 4 jours       | 14 600 "                                                 | 79 600 "                                                 | 753 000 "                                                  |

## 2 - Electrophorèse

L'étude de la liaison des protéines sériques Humaines et de Lapin avec le chlorure mercurique et l'acétate mercurique a été conduite selon le plan suivant :

Dans un premier temps nous avons étudié l'influence du tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et du tampon véronal, véronal sodique sur le transport de ces deux composés mercuriels par les protéines sériques au cours de la migration électrophorétique.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'influence de doses croissantes de mercure sous la forme de chlorure mercurique et d'acétate mercurique sur cette liaison par les protéines.

Les essais d'électrophorèse ont été effectués sur support de Cellogel et de papier selon les techniques décrites dans le Chapitre V.

Pour toutes nos expériences, nous avons adopté pour la mise en contact du sérum et d'un des composés mercuriels le protocole opératoire utilisé pour le MHP et la Chlormérodine, c'est-à-dire : mise en contact pendant 5 minutes à 37° avec agitation du sérum frais ou au maximum vieux de 24 heures après conservation à 4°, avec le composé mercuriel dilué ou non.

a) Etude de l'influence du tampon de MICHAELIS et du tampon véronal, véronal sodique sur le transport par les protéines sériques du chlorure mercurique et de l'acétate mercurique au cours de la migration électrophorétique

Pour cette série d'expériences, nous avons adopté des concentrations de 1  $\mu$ g de Hg par gramme de protéines pour chacun des composés mercuriels.

La concentration en mercure des solutions de chacun des deux composés mercuriels est calculée par le rapport de leur activité spécifique et de leur activité volumique.

La concentration en protéines par ml de sérum est évaluée par densitométrie à 280 m $\mu$  à partir de la courbe (figure 10) reliant la densité optique à la teneur en protides.

#### - Résultats

Quels que soient la nature du sérum, le support d'électrophorèse, la composition du tampon, le composé mercuriel, nous observons toujours le même résultat. Le chlorure mercurique ou l'acétate mercurique se trouvent fixés par toutes les fractions protéiques. Cependant dans le cas de la migration électrophorétique en présence de tampon de MICHAELIS, nous avons remarqué une diminution de la fixation de l'acétate mercurique par l'albumine. Pour le chlorure mercurique, nous n'avons observé aucune modification. D'autre part, sur les autoradiographies, si nous retrouvons les différentes fractions protéiques, nous observons aussi entre ces fractions une traînée continue de radioactivité (figures 37 et 38).

#### b) Etude de l'influence de doses croissantes de Hg sur le transport du chlorure mercurique et de l'acétate mercurique par les protéines sériques

Cette étude a été exécutée par migration électrophorétique avec le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et du sérum de Lapin.

#### - Résultats

Cette série d'expériences avec des doses croissantes de Hg sous la forme de chlorure mercurique et d'acétate mercurique ne nous a rien apporté de plus que les expériences faites précédemment avec 1  $\mu$ g de Hg. L'étude de doses inférieures à 1  $\mu$ g, soit 0,01  $\mu$ g nous a donné toujours le même résultat, c'est-à-dire une fixation de ces deux composés mercuriels sur toutes les fractions protéiques avec entre ces fractions protéiques marquées sur l'autoradiographie, une traînée radioactive. Nous avons noté qu'au fur et à mesure que la concentration en mercure par rapport à 1 g de protéines augmentait, les autoradiographies des fractions protéiques devenaient moins nettes et que la traînée radioactive entre ces fractions devenaient plus sombre.

### 3 - Immuno-électrophorèse

Par la technique d'immuno-électrophorèse, développée dans le Chapitre V, nous avons cherché à connaître plus exactement sur quelles protéines le chlorure mercurique et l'acétate mercurique se fixaient.

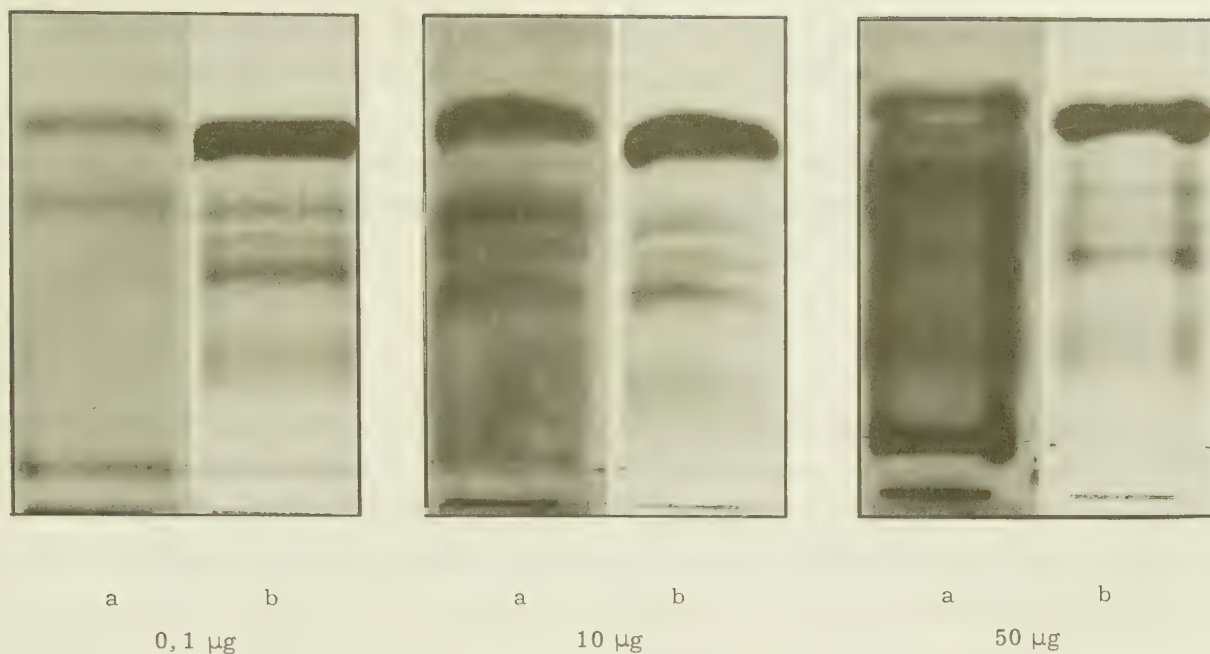


Figure 37 - Fixation de quantités croissantes de chlorure mercurique par du sérum de Lapin.  
Migration électrophorétique faite avec du tampon de MICHAELIS.

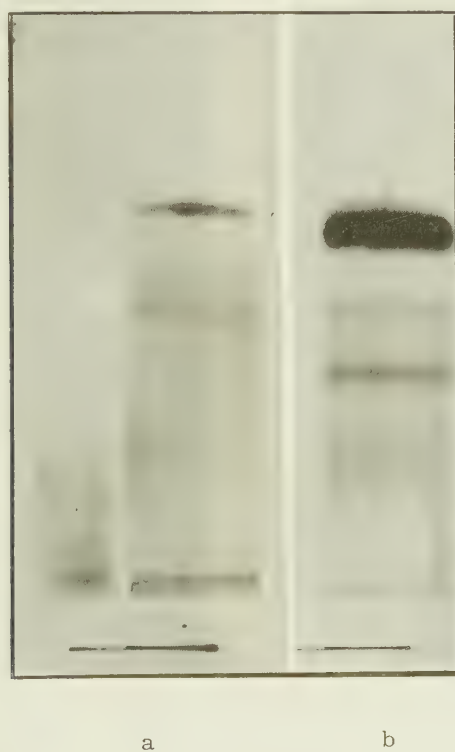


Figure 38 - Fixation d'acétate mercurique par les protéines sériques de Lapin.  
a : autoradiographie                      b : électrophorégramme

Cette étude a été faite avec le tampon de MICHAELIS et le tampon véronal de pH = 8,2 cité dans le mode opératoire, ainsi qu'avec des sérums Humain et de Lapin.

Cette technique d'immuno-électrophorèse ne nous a pas permis de déceler des quantités de mercure inférieures à 20  $\mu$ g le chlorure mercurique et l'acétate mercurique que nous avons utilisés étant marqué au  $^{197}\text{Hg}$ .

#### - Résultats

Dans le cas du chlorure mercurique, à la dose de 20  $\mu$ g, l'arc de précipitation de l'albumine n'est pas visible car une partie de ces protéines a été précipitée par le composé mercuriel. Toutes les autres fractions protéiques par contre ont fixé ce sel mercurique sans subir de modifications visibles. L'acétate mercurique à cette même dose de 20  $\mu$ g se trouve lié à toutes les fractions protéiques.

La figure 39 montre ces résultats.



Figure 39 - Fixation du chlorure mercurique par les protéines sériques Humaines

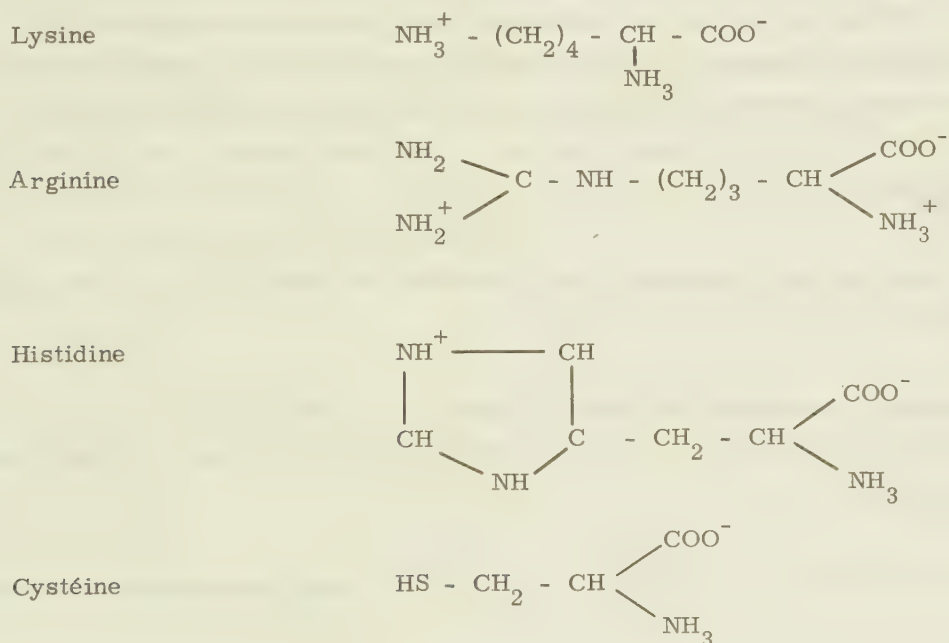
A - Immuno-électrophorèse

B - Autoradiogramme correspondant

## ETUDE DE LA LIAISON DE QUELQUES ACIDES AMINES AVEC LE MHP

Au cours de nos recherches sur le transport par les protéines sériques du MHP et de la Chlormérodine, nous avons pu constater que dans la majorité des cas, ces composés mercuriels étaient fixés préférentiellement par l'albumine et que dans un cas très particulier ils se trouvaient liés par les  $\alpha$  globulines.

Nous avons voulu dans ce chapitre étudier la liaison du MHP avec certains acides aminés : Lysine, Arginine, Histidine et Cystéine qui dans la structure primaire des protéines, présentent des chaînes latérales disponibles en milieu alcalin.



Ces acides aminés sont présents dans la structure de toutes les protéines sériques en particulier dans l'albumine chez laquelle on trouve sur les 566 acides aminés dont elle est formée : 59 molécules de Lysine, 25 d'Arginine, 16 d'Histidine et 35 de Cystéine parmi lesquelles 34 sont associées en 17 unités de Cystine et la 35ème libre, forme les mercaptides.

Dans le Chapitre II sur la structure des protéines, nous avons montré que l'ion mercurique avait une affinité beaucoup plus importante pour les groupements sulfhydriles que pour les groupements aminés, et que la liaison avec les uns et les autres était possible. Si nous connaissons actuellement les constantes de dissociation du groupement aminé de la lysine, guanidine de l'arginine, imidazole de l'histidine, sulfhydryle de la cystéine quand ces acides aminés sont isolés, nous ne connaissons pas ces constantes lorsque ces acides aminés sont intégrés dans une chaîne peptidique. Dans le cas de la cystéine isolée par exemple, la valeur de  $pK_{SH}$  est d'environ 8,5. Si la cystéine fait partie d'une protéine et se trouve au voisinage d'un ion carboxyle, cette valeur deviendra alors égale à 10. Le nombre de charges qui entourent la molécule de cystéine au sein d'une protéine étant très grand, il est à peu près impossible de connaître le  $pK$  exact du groupement thiol. D'autant qu'à l'influence des autres groupes chargés présents dans la molécule protéique, il faut ajouter les effets des hydrogènes et des liaisons hydrophobes.

Le but de cette dernière série d'expériences est de chercher une liaison éventuelle entre le MHP et ces quatre acides aminés isolés dont les  $pK$  des chaînes latérales se situent dans une zone de  $pH$  voisine de 8,6.

#### - Principe

A deux séries de solutions de chaque acide aminé, préparée la première avec de l'eau distillée, la deuxième avec du tampon de MICHAELIS de  $pH = 8,6$ , nous avons ajouté des quantités égales de MHP. Chaque série de solutions radioactives est alors soumise à une migration électrophorétique en présence de tampon de MICHAELIS de  $pH = 8,6$ .

#### - Technique

Nous avons utilisé la technique d'électrophorèse sur papier et d'autoradiographie développées au Chapitre V.

A l'extrémité cathodique des bandes de papier, nous avons déposé 10  $\mu l$  du mélange d'un acide aminé et de MHP. Pour la cystéine, le dépôt doit être fait à l'extrémité anodique de la bande d'électrophorèse.

Sur une des bandes nous déposons du MHP seul en quantité équivalente aux autres dépôts.

Après migration électrophorétique, les électrophorégrammes sont mis en contact avec le film radio avant de révéler les acides aminés par de la Ninhydrine.

- Résultats  
-----

Après révélation des autoradiographies et des électrophorégrammes, nous avons constaté que le MHP n'était fixé par aucun des acides aminés. La tâche radioactive du MHP se trouvait au même niveau pour les quatre acides aminés et ceux-ci avaient migré beaucoup plus loin.

- CONCLUSION

1 - Le transport par les protéines sériques de dérivés mercuriels plus ionisables que le MHP et la Chlormérodine nous a permis de constater qu'une partie du mercure ionique se fixait sur toutes les fractions protéiques, préférentiellement sur l'albumine. Le reste du produit mercuriel non fixé, migrait en se décomposant au fur et à mesure de la migration. Dans le cas du mercure ionique, le tampon acétate de MICHAELIS n'intervient pas sur la liaison formée entre l'albumine et le mercure. Nous pouvons donc penser que le MHP et la Chlormérodine ne sont pas décomposés lorsqu'ils sont soumis à une migration électrophorétique en présence de sérum, qu'ils agissent sous la forme  $(R - Hg)^+$  mais que la liaison qu'ils forment avec certaines chaînes latérales de l'albumine est suffisamment faible pour être sensible au tampon de MICHAELIS au cours de la migration.

2 - L'étude par électrophorèse d'une liaison éventuelle entre le MHP et certains acides aminés isolés ne nous a pas permis de connaître auxquels de ces acides aminés le MHP était fixé préférentiellement lors de son transport par les protéines sériques. Ceci nous montre l'importance d'action de l'environnement de ces chaînes latérales au sein des molécules protéiques et nous permet de supposer que si cet environnement est modifié nous puissions ne plus avoir de fixation entre certaines protéines et le MHP .



CHAPITRE IX

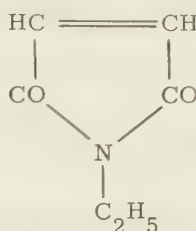
---

ACTION D'UN THIOLOPRIVE, LE N-ETHYL-MALEIMIDE SUR LA  
LIAISON DES PROTEINES SERIQUES AVEC DES COMPOSES MERCURIELS

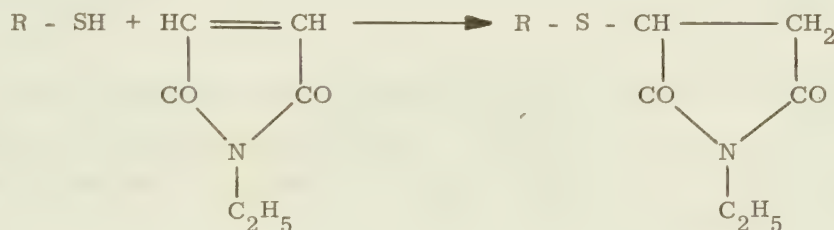


Comme nous l'avons montré dans le Chapitre II sur la structure des protéines, pour de nombreux auteurs, la liaison des composés mercuriels et des protéines se forme au niveau des groupements sulfhydriques libres et dans une zone de pH alcalin au niveau des ponts disulfures des protéines. Nous avons voulu dans ce chapitre vérifier à l'aide d'un thioloprive, le N-éthyl-maléimide, si les composés mercuriels (MHP, Chlormérodine, chlorure mercurique, acétate mercurique) dont nous venons d'étudier le transport par les protéines sériques se fixaient à celles-ci par l'intermédiaire des groupements thiols.

Le N-éthyl-maléimide



est un composé organique utilisé par de nombreux auteurs pour se combiner à des composés organiques soufrés porteurs de groupements thiols. La réaction se produit au niveau de la double liaison suivant ce schéma :



FRIEDMANN (1952) montra que le N-éthyl-maléimide réagissait spécifiquement et rapidement avec les groupements sulfhydriques de la cystéine et du glutathion. GREGORY (1955) confirma les travaux de FRIEDMANN en montrant que le composé formé était stable entre pH 5 et pH 8. LIGHT (1963) l'utilisa pour stabiliser les composés porteurs de groupements SH et montra que l'on pouvait l'employer pour titrer les groupements thiols des protéines. Cependant SMYTH et ses collaborateurs (1960) mirent en évidence que le N-éthyl-maléimide n'était pas spécifique uniquement des groupements thiols, mais pouvait réagir aussi avec des dérivés imidazoles. ELLIS (1966) l'employa avec succès pour l'étude du métabolisme du soufre au niveau cellulaire.

### - Principe

Au mélange de N-éthyl-maléimide et de sérum préparé selon un protocole opératoire défini, nous ajoutons le composé mercuriel en quantité voulue. Ce nouveau mélange est fractionné par électrophorèse dans le but de mettre en évidence le comportement du N-éthyl-maléimide vis-à-vis de la liaison formée entre les protéines sériques et l'un des composés mercuriels.

Nous étudierons dans ce chapitre successivement :

- 1) la fixation du N-éthyl-maléimide par les protéines sériques. Cette étude sera faite par migration électrophorétique sur Cellogel avec du N-éthyl-maléimide marqué au  $^{14}\text{C}$  fixée sur le radical éthyl.
- 2) l'action du N-éthyl-maléimide sur la liaison formée entre les protéines sériques totales et les composés organo-mercuriels (MHP et Chlormérodrene) ainsi que sur la liaison formée entre l'albumine et ces mêmes composés.
- 3) l'action du N-éthyl-maléimide sur la liaison entre les protéines sériques totales et le chlorure mercurique ainsi que l'acétate mercurique.

### - Technique

Les essais ont été effectués :

- Avec deux sérums différents (Homme et Lapin) dont les protéines n'ont pas le même nombre de groupements thiols libres et de ponts disulfures. Nous pourrions ainsi voir des réactions différentes à l'égard du N-éthyl-maléimide, bien que nous ayons obtenu les mêmes résultats de fixation des organo-mercuriels.
- Avec deux tampons différents : le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et le tampon véronal, véronal sodique de même pH, afin de vérifier l'action du N-éthyl-maléimide dans le cas particulier de fixation sur les  $\alpha$  globulines.
- Nous avons fait l'étude de l'action du N-éthyl-maléimide sur la liaison organo-mercuriel-protéines à l'aide de la technique de migration électrophorétique sur Cellogel indiquée dans le Chapitre V, de même que la préparation des autoradiographies.

1 - Etude de la migration électrophorétique du N-éthyl-maléimide marqué au  $^{14}\text{C}$

a) Comportement du N-éthyl-maléimide seul vis-à-vis de la migration électrophorétique

A l'extrémité cathodique d'une bande de Cellogel, nous déposons 1  $\mu\text{l}$  de la solution de N-éthyl-maléimide marqué au  $^{14}\text{C}$ , et nous laissons migrer le temps nécessaire à la séparation des protéines. Cette expérience est réalisée d'une part avec le tampon de MICHAELIS, d'autre part avec le tampon véronal-véronal sodique.

- Résultats  
-----

Ces expériences ont permis de constater qu'au pH 8,6 où nous opérons, le N-éthyl-maléimide ne migrerait pas. Sur les autoradiographies nous retrouvons ce composé organique au niveau du dépôt.

b) Fixation du N-éthyl-maléimide marqué au  $^{14}\text{C}$  sur les protéines sériques

Cette étude a été faite à différentes concentrations de N-éthyl-maléimide par rapport à 1 g de protéines. Le mélange du composé organique et du sérum frais était mis en contact 1 heure à 37° avec agitation avant d'être déposé sur le support d'électrophorèse afin de s'assurer la liaison du N-éthyl-maléimide aux protéines.

- Résultats  
-----

Dans le tableau XXXII nous avons réuni les résultats concernant la fixation de doses croissantes de N-éthyl-maléimide par les protéines sériques.

TABLEAU XXXII

Fixation du N-éthyl-maléimide marqué par les protéines sériques

| Quantité de N-éthyl-maléimide en mg/g de protéines | Fractions protéiques |          |         |          |     |
|----------------------------------------------------|----------------------|----------|---------|----------|-----|
|                                                    | Dépôt                | $\gamma$ | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| 0,16 mg                                            |                      |          |         |          | ++  |
| 1 mg                                               |                      | +        | +       | +        | ++  |
| 5 mg                                               |                      | +        | ++      | ++       | +++ |
| 25 mg                                              | +                    | ++       | ++      | ++       | +++ |

Cette série d'expériences nous permet de constater qu'à partir de la dose de 1 mg de N-éthyl-maléimide pour 1 g de protéines, ce composé organique se fixe sur toutes les fractions protéiques. Pour des doses inférieures à 1 mg seule l'albumine le fixe et à partir de 25 mg pour 1 g de protéine il y a saturation des sites de fixation des protéines à l'égard du N-éthyl-maléimide, car nous en retrouvons au dépôt (figures 40 et 41). Quel que soit le tampon d'électrophorèse utilisé, nous obtenons strictement le même résultat ainsi que pour les deux variétés de sérum.

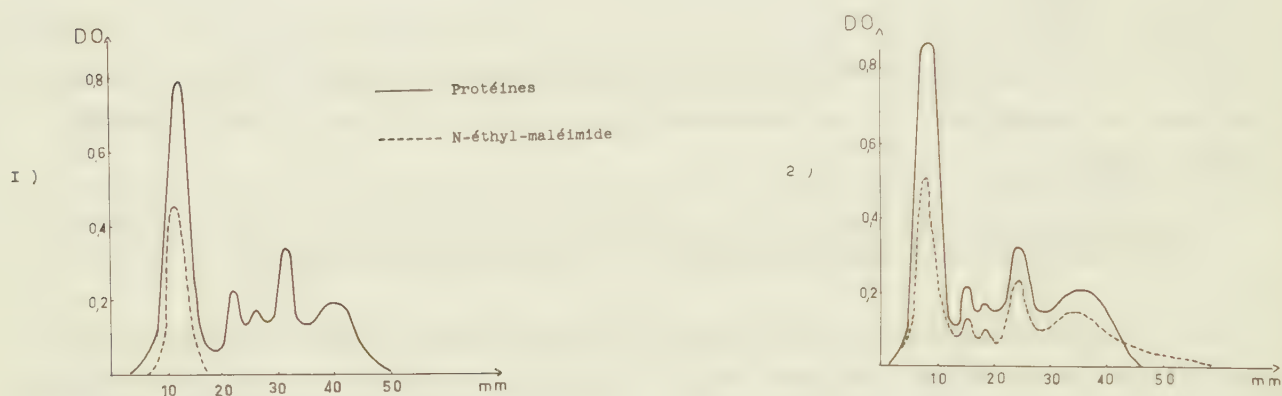


Figure 41 - 1) Fixation de 0,16 mg de N-éthyl-maléimide par l'albumine  
2) Fixation de 5 mg de N-éthyl-maléimide par toutes fractions protéiques.

Sachant que chaque molécule d'albumine ne possède qu'un seul groupement thiol libre quand il n'est pas transformé en pont disulfure pour lier deux molécules d'albumine l'une à l'autre, nous avons choisi des quantités de N-éthyl-maléimide telles que nous pensons pouvoir bloquer tous les groupements thiols libres des albumines. Les sérums Humains et de Lapin que nous avons utilisé contiennent en moyenne 0,60 g d'albumine pour 1 g de protéines. Connaissant le poids moléculaire de l'albumine 69 000 et celui du N-éthyl-maléimide 125,13, nous calculons qu'il nous faudra 1 mg de ce composé organique pour saturer tous les groupements SH libres des albumines contenues dans 1 g de protéines. En ajoutant des doses supérieures à 1 g de N-éthyl-maléimide par g de protéines, nous pensons arriver à bloquer tous les groupements thiols libres des protéines sériques.

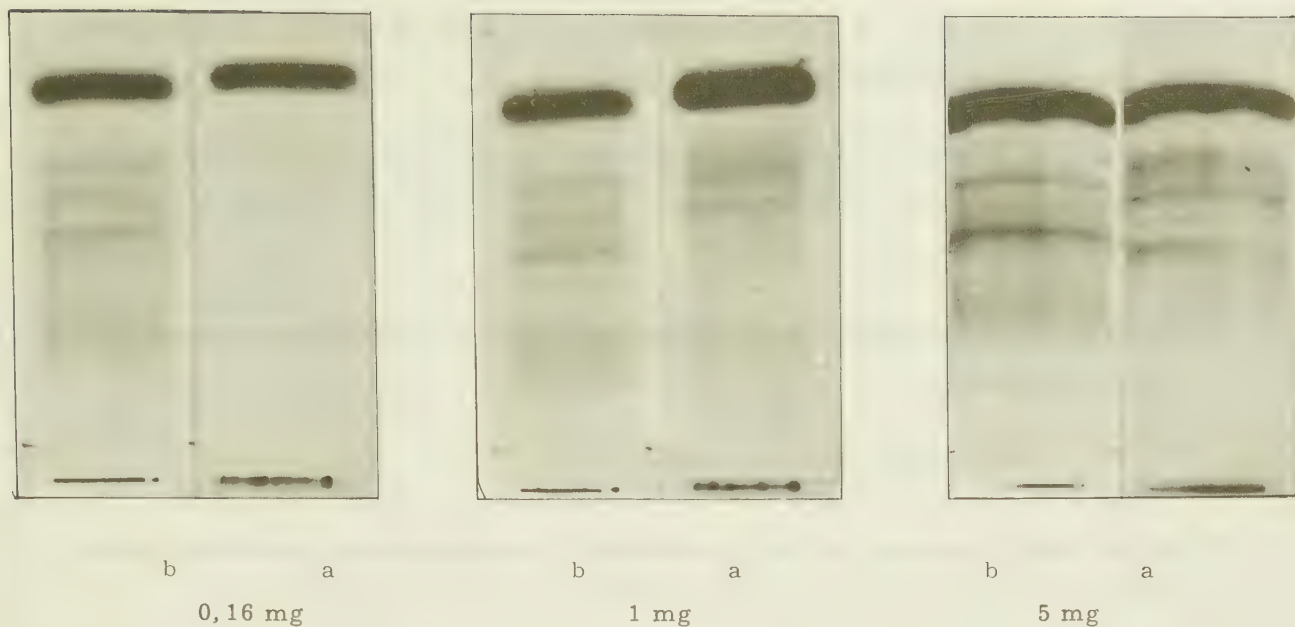


Figure 40 - Fixation de doses croissantes de N-éthyl-maléimide par du sérum de Lapin.  
Migration électrophorétique faite avec du tampon de MICHAELIS.

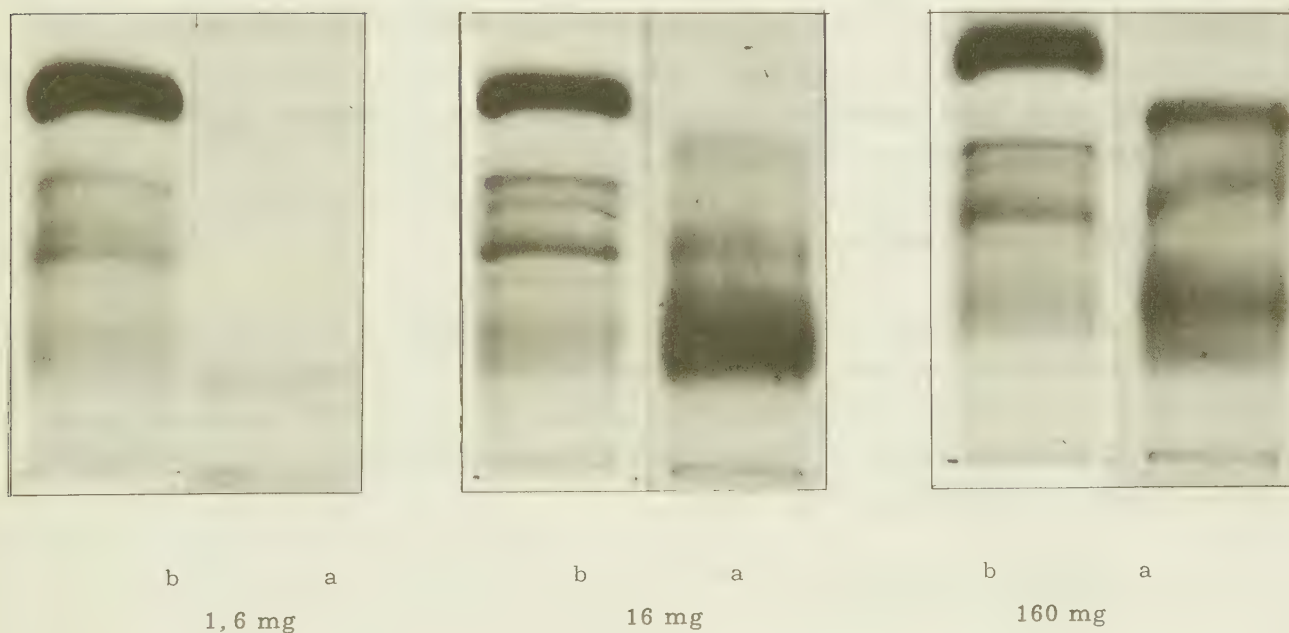


Figure 42 - Fixation de 1 µg de mercure sous la forme de MHP, en présence de doses croissantes de N-éthyl-maléimide.  
Migration électrophorétique faite avec le tampon de MICHAELIS.

a : autoradiographie  
b : électrophorégramme

2 - Etude de l'action éventuelle du N-éthyl-maléimide sur la liaison du MHP ou de la Chlormé-  
rodrine aux protéines sériques

Nous étudierons successivement l'action du N-éthyl-maléimide sur la liaison des protéines sériques totales avec ces deux composés mercuriels, puis sur la liaison de l'albumine avec ces mêmes composés.

A - Action du N-éthyl-maléimide sur la liaison des protéines sériques totales avec le MHP  
et la Chlormérodrine

Au cours de cette étude nous verrons :

- 1 - L'action de doses croissantes de N-éthyl-maléimide vis-à-vis de la liaison des composés mercuriels aux protéines pour la dose de 1  $\mu$ g de mercure par 1 g de protéines.
- 2 - L'action de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide pour 1 g de protéines sur la liaison des composés mercuriels avec les protéines, pour les doses croissantes de mercure ramenées à 1 g de protéines.

Ces deux séries d'expériences ont été faites avec chacun des organo-mercuriels, ainsi que sur des sérums Humains et de Lapin et avec deux tampons d'électrophorèse différents : le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et le tampon véronal-véronal sodique de même pH.

1 - Action de doses croissantes de N-éthyl-maléimide sur la liaison de 1  $\mu$ g de Hg  
avec 1 g de protéines

a) Expériences faites avec le MHP

Après avoir préparé les mélanges de N-éthyl-maléimide et de sérum frais, nous les laissons en contact au minimum 1 heure à 37° avec agitation. A ces mélanges nous ajoutons 1  $\mu$ g de Hg par g de protéines sous la forme d'une solution au  $\frac{1}{100}$  de MHP ayant un pH initial de 9,5 et nous laissons à nouveau en contact 5 mn à 37° sous agitation avant de soumettre la solution finale à la migration électrophorétique.

- Résultats

Les résultats ont été rassemblés dans les tableaux XXXIII et XXXIV.

TABLEAU XXXIII

Action de doses croissantes de N-éthyl-maléimide sur la fixation du MHP  
à raison de 1  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines  
Etude faite avec le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6

| Doses croissantes de<br>N-éthyl-maléimide en<br>mg/g de protéines | Fractions protéiques |          |         |          |     |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------|----------|---------|----------|-----|
|                                                                   | Dépôt                | $\gamma$ | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| 0                                                                 |                      |          |         | +++      |     |
| 0,16 mg                                                           | +                    |          |         | +++      |     |
| 1,6 "                                                             | +++                  |          |         |          |     |
| 16 "                                                              | ++                   |          | +       | +        |     |
| 160 "                                                             | ++                   |          | +       | ++       |     |
| 320 "                                                             | ++                   |          | +       | +++      |     |

Pour 1  $\mu$ g de Hg par g de protéines, à la dose de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide, pour la même quantité de protéines, nous pouvons observer que le MHP ne se fixe plus sur aucune protéine. Mais à des doses inférieures et supérieures à 1,6 mg, le N-éthyl-maléimide n'empêche pas la fixation du MHP par les protéines. Cette fixation d'ailleurs augmente avec la quantité de N-éthyl-maléimide. Pour les deux tampons utilisés, nous observons ce phénomène d'inhibition de la liaison MHP-protéines à la dose de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide et de reformation de cette liaison pour des doses supérieures à 1,6 mg (figure 42).

TABLEAU XXXIV

Action de doses croissantes de N-éthyl-maléimide sur la fixation du MHP  
à raison de 1  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines  
Etude faite en présence de tampon véronal

| Doses croissantes de<br>N-éthyl-maléimide en<br>mg/g de protéines | Fractions protéiques |          |         |          |     |
|-------------------------------------------------------------------|----------------------|----------|---------|----------|-----|
|                                                                   | Dépôt                | $\gamma$ | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| 0                                                                 |                      |          |         |          | +++ |
| 0,16 mg                                                           | +                    |          |         |          | +++ |
| 1,6 "                                                             | +++                  |          |         |          |     |
| 16 "                                                              | ++                   |          | +       | +        | +   |
| 160 "                                                             | ++                   |          | +       | +        | +   |
| 320 "                                                             |                      |          | +       | +        | +++ |

Cependant dans le cas du tampon de MICHAELIS, nous observons un blocage total des sites de liaison de l'albumine vis-à-vis du composé mercuriel.

b) Expériences faites avec la Chlormérodine

Comme pour la série d'expériences précédentes, nous avons préparé des mélanges de N-éthyl-maléimide en quantités croissantes et de sérum frais en les laissant en contact 1 h à 37° avec agitation. A ces mélanges nous avons ajouté de la Chlormérodine à raison de 1  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines.

Les résultats obtenus sont strictement identiques à ceux observés avec le MHP. Nous retrouvons le phénomène d'inhibition de la liaison du composé mercuriel aux protéines pour la dose de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide, ainsi que le phénomène de fixation sur les protéines pour des valeurs supérieures à 1,6 mg.

2 - Action de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide pour 1 g de protéines vis-à-vis de la liaison de quantités croissantes de composés mercuriels aux protéines sériques

A des mélanges de 1 ml de sérum et de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide pour 1 g de protéines, préparés selon le protocole établi précédemment, nous ajoutons des quantités croissantes de composé mercuriel et laissons en contact 5 mn à 37° avec agitation. Pour le MHP nous utilisons une solution mère de pH = 9,5 que nous diluons au  $\frac{1}{100}$ . Ces solutions de sérum sont

soumises à la migration électrophorétique avec d'une part le tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 et d'autre part le tampon véronal-véronal sodique de même pH.

a) Résultats obtenus avec des quantités croissantes de MHP

Les résultats obtenus avec le tampon de MICHAELIS et le tampon véronal ont été rassemblés dans les tableaux XXXV et XXXVI. Au cours de cette série d'expériences, nous avons pu constater qu'à la dose de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide pour 1 g de protéines, tous les sites de liaison des albumines et des globulines auxquels peuvent se fixer les composés mercuriels ne sont pas bloqués puisqu'à partir de 10 µg de Hg nous pouvons observer à nouveau une fixation du MHP sur ces protéines. Nous noterons que la présence du tampon de MICHAELIS de pH = 8,6 inhibe la liaison entre l'albumine et le MHP.

TABLEAU XXXV

Action de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide sur la liaison de quantités croissantes de MHP avec des protéines sériques  
Etude faite avec le tampon de MICHAELIS

| Doses croissantes de MHP en µg de Hg/g de protéines | Fractions protéiques |   |   |       |
|-----------------------------------------------------|----------------------|---|---|-------|
|                                                     | Dépôt                | γ | β | α alb |
| 1 µg                                                | +++                  |   |   |       |
| 5 µg                                                | +++                  |   |   |       |
| 10 µg                                               | +++                  |   | + | +     |
| 30 µg                                               | +++                  |   | + | ++    |

TABLEAU XXXVI

Action de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide sur la liaison de quantités croissantes de MHP avec les protéines sériques  
Etude faite avec le tampon véronal

| Doses croissantes de MHP en µg de Hg/g de protéines | Fractions protéiques |   |   |       |
|-----------------------------------------------------|----------------------|---|---|-------|
|                                                     | Dépôt                | γ | β | α Alb |
| 1 µg                                                | +++                  |   |   |       |
| 5 µg                                                | +++                  |   |   |       |
| 10 µg                                               | +++                  |   |   | +     |
| 30 µg                                               | +++                  |   | + | ++    |

b) Résultats obtenus avec des quantités croissantes de Chlormérodrene

Pour la Chlormérodrene, nous avons observé des résultats identiques à ceux obtenus avec le MHP. Pour une concentration de 10  $\mu$ g de Hg, nous avons vérifié que la Chlormérodrene se fixait à nouveau sur les  $\alpha$  globulines dans le cas du tampon de MICHAELIS et sur les albumines dans le cas du tampon véronal, comme si le N-éthyl-maléimide n'avait pas saturé tous les sites de liaison (figures 44 et 45).

Les deux sérums d'Homme et de Lapin ont présenté les mêmes réactions vis-à-vis du N-éthyl-maléimide et de son action sur la liaison des organo-mercuriels avec les protéines.

B - Action du N-éthyl-maléimide sur la liaison entre l'albumine d'une part, l'albumine en présence d' $\alpha$  globulines d'autre part et le MHP

Dans cette série d'expériences, nous avons cherché à connaître l'action de doses croissantes de N-éthyl-maléimide sur la liaison entre le MHP et l'albumine pure ainsi que sur la liaison entre le MHP et le mélange de 98 % d'albumine et de 2 % d' $\alpha$  globulines.

Nous n'avons pas pensé nécessaire d'étudier l'action du thioloprive sur la liaison entre la Chlormérodrene et ces deux protéines, son attitude à l'égard du sérum total en présence de N-éthyl-maléimide étant strictement identique à celle du MHP.

- Technique

La veille de l'expérience nous préparons les deux gammes des solutions suivantes, en mettant en contact des quantités croissantes de N-éthyl-maléimide : 1 mg, 1,6 mg, 16 mg, 160 mg pour 1 g de protéines avec d'une part des solutions d'albumine pure et d'autre part des solutions d'albumine et d' $\alpha$  globulines. 5 minutes avant la migration électrophorétique, nous ajoutons dans chaque solution 1  $\mu$ g de Hg pour 1 g de protéines, sous la forme d'une solution au  $\frac{1}{100}$  de MHP. Les mélanges sont alors soumis à une agitation dans une enceinte chauffée à 37° puis déposés sur les bandes de Cellogel à raison de 1  $\mu$ l par bande.

L'étude de l'action du N-éthyl-maléimide a été faite par migration électrophorétique en présence de tampon de MICHAELIS et de tampon véronal.

La technique d'électrophorèse, la préparation des autoradiographies et des électrophorégrammes sont indiqués dans le Chapitre V.

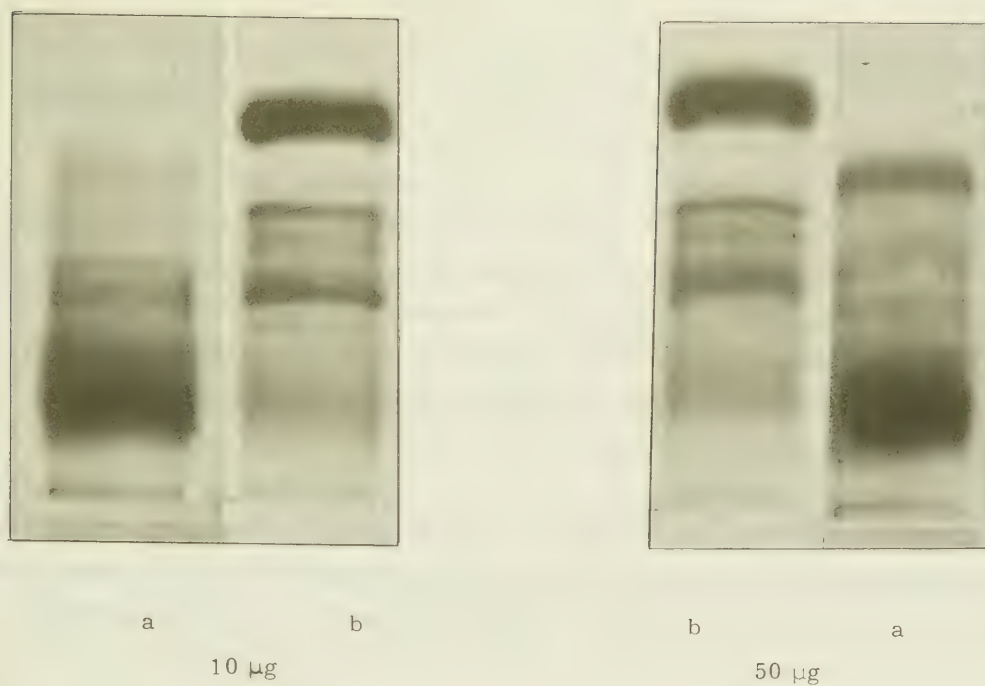


Figure 44 - Fixation de quantités croissantes de Chlormérodrene en présence de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide.  
Migration électrophorétique avec le tampon de MICHAELIS.

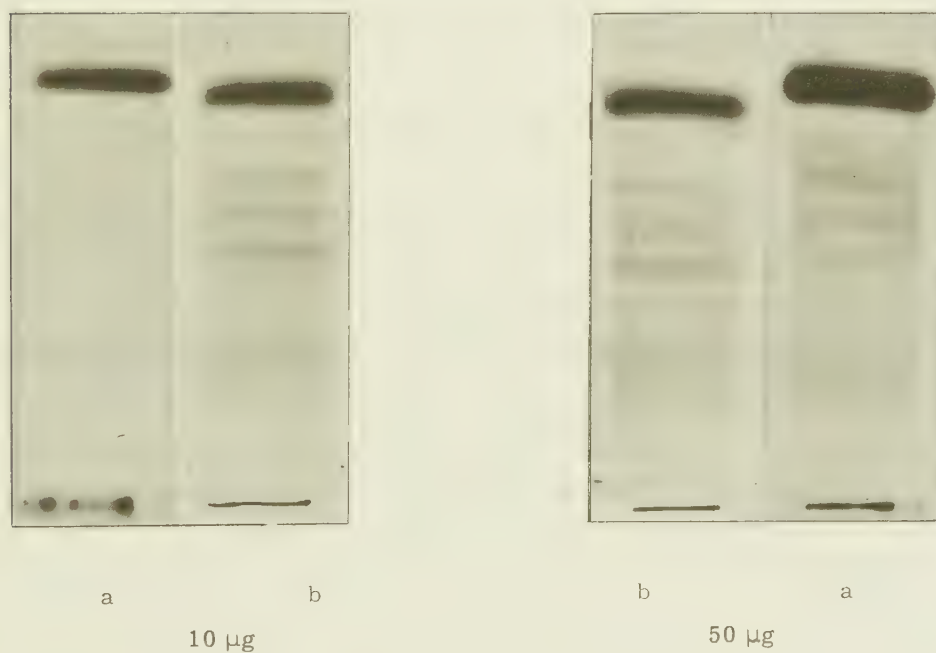


Figure 45 - Fixation de quantités croissantes de Chlormérodrene en présence de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide.  
Migration électrophorétique avec le tampon véronal.

a : autoradiographie  
b : électrophorégramme

- Résultats

Les résultats de ces expériences ont été groupés dans les tableaux XXXVII et XXXVIII.

Comme dans le cas du sérum total, nous observons que pour des valeurs voisines de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide pour 1 g de protéines, les sites de liaison de l'albumine et des globulines vis-à-vis du composé mercuriel sont bloqués quel que soit le tampon d'électrophorèse. Nous observons aussi qu'en augmentant la dose de thioloprive pour toujours la même dose de mercure, le composé mercuriel est fixé à nouveau par les protéines.

Nous avons noté toutefois qu'à la dose de 16 mg de N-éthyl-maléimide, en présence du tampon de MICHAELIS, nous n'avons aucune fixation du composé mercuriel avec l'albumine et les  $\alpha$  globulines alors qu'en présence du tampon véronal, cette fixation apparaît à nouveau.

TABLEAU XXXVII

Action de doses croissantes du N-éthyl-maléimide sur la liaison du MHP avec le mélange d'albumine et d' $\alpha$  globulines après migration électrophorétique en présence du tampon de MICHAELIS et du tampon véronal

| N-éthyl-maléimide | Tampon de MICHAELIS |          | Tampon véronal |          |
|-------------------|---------------------|----------|----------------|----------|
|                   | Alb                 | $\alpha$ | Alb            | $\alpha$ |
| 1 mg              | ++                  | +        | +++            |          |
| 1,6 mg            |                     |          |                |          |
| 16 mg             |                     |          | +              |          |
| 160 mg            | +                   | +        | ++             | +        |

TABLEAU XXXVIII

Action de doses croissantes du N-éthyl-maléimide sur la liaison MHP-albumine après migration électrophorétique en présence du tampon de MICHAELIS et du tampon véronal

| N-éthyl-maléimide | Tampon de MICHAELIS |          | Tampon véronal |          |
|-------------------|---------------------|----------|----------------|----------|
|                   | Alb                 | $\alpha$ | Alb            | $\alpha$ |
| 1 mg              | ++                  |          | +++            |          |
| 1,6 mg            |                     |          |                |          |
| 16 mg             |                     |          | +              |          |
| 160 mg            | +                   |          | ++             |          |

### 3 - Action du N-éthyl-maléimide sur la liaison entre les protéines sériques et le chlorure mercurique d'une part et l'acétate mercurique d'autre part

Le chlorure mercurique et l'acétate mercurique se fixant à l'albumine quelle que soit la composition du tampon d'électrophorèse utilisé et étant plus facilement ionisables que le MHP et la Chlormérodine, nous avons voulu connaître l'action du N-éthyl-maléimide dans leurs cas.

Cette étude a été faite uniquement sur du sérum total de Lapin et par la méthode d'électrophorèse sur Cellogel en présence du tampon de MICHAELIS à pH = 8,6. Nous avons étudié successivement l'action de doses croissantes de N-éthyl-maléimide pour une même dose de Hg et l'action d'une dose définie de thiolprive pour des doses croissantes de mercure.

#### A - Etude de l'action de doses croissantes de N-éthyl-maléimide sur la liaison entre les protéines sériques et 1 µg de Hg sous forme de chlorure mercurique d'une part et d'acétate mercurique d'autre part

##### - Technique

Le protocole opératoire de préparation des mélanges de sérum, N-éthyl-maléimide et composé mercuriel est le même que celui utilisé pour le MHP et la Chlormérodine.

##### - Résultats

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XXXIX.

Comme dans le cas des composés organo-mercuriels, nous constatons que pour 1 µg de Hg tous les sites de liaisons des protéines sériques vis-à-vis des composés mercuriels sont bloqués pour la dose de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide et que pour des doses supérieures à 16 mg de N-éthyl-maléimide, nous avons à nouveau une liaison composé mercuriel-protéines même avec les albumines.

TABLEAU XXXIX

Fixation de 1 µg de Hg en présence de quantités croissantes de N-éthyl-maléimide, sur les protéines sériques

| N-éthyl-maléimide | Acétate mercurique |   |   |   |     | Chlorure mercurique |   |   |   |     |
|-------------------|--------------------|---|---|---|-----|---------------------|---|---|---|-----|
|                   | Dépôt              | γ | β | α | Alb | Dépôt               | γ | β | α | Alb |
| 1 mg              |                    | + | + | + | ++  |                     | + | + | + | ++  |
| 1,6 mg            |                    |   |   |   |     |                     |   |   |   |     |
| 16 mg             |                    | + | + | + | +   |                     | + | + | + | +   |
| 160 mg            |                    | + | + | + | ++  |                     | + | + | + | ++  |

B - Etude de l'action de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide sur la liaison du mercure avec les protéines sériques en fonction de doses croissantes de chlorure mercurique et d'acétate mercurique

- Technique

Le protocole opératoire pour préparer les mélanges de sérum, de N-éthyl-maléimide et de composés mercuriels n'a pas été modifié par rapport à celui qui a été utilisé pour le MHP.

- Résultats

Dans le tableau XXXX ont été réunis les résultats.

Par cette dernière série d'expériences, nous pouvons constater que pour la dose de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide, nous n'avons aucune fixation des composés mercuriels à la dose de 1  $\mu$ g de Hg par g de protéines, mais qu'à 5  $\mu$ g de Hg nous obtenons à nouveau une fixation.

TABLEAU XXXX

Fixation par les protéines sériques de quantités croissantes  
de Hg en présence de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide

| Composés mercuriels    | Fractions protéiques |          |         |          |     |
|------------------------|----------------------|----------|---------|----------|-----|
|                        | Dépôt                | $\gamma$ | $\beta$ | $\alpha$ | Alb |
| Acétate<br>mercurique  | 1 $\mu$ g            |          |         |          |     |
|                        | 5 $\mu$ g            | +        | +       | +        | +   |
|                        | 10 $\mu$ g           | +        | +       | +        | ++  |
| Chlorure<br>mercurique | 1 $\mu$ g            |          |         |          |     |
|                        | 5 $\mu$ g            | +        | +       | +        | +   |
|                        | 10 $\mu$ g           | +        | +       | +        | ++  |

Que nous opérons en présence de N-éthyl-maléimide ou non, la fixation par les protéines sériques de ces deux composés mercuriels n'est jamais aussi nette qu'avec le MHP et la Chlormérodine. Nous observons toujours quand il y a une liaison avec les protéines, une traînée de radioactivité entre les fractions protéiques.

## - DISCUSSION ET CONCLUSION

L'étude de la fixation par les protéines sériques du N-éthyl-maléimide marqué au  $^{14}\text{C}$  nous a permis de constater que ce composé organique est lié par toutes les fractions protéiques à la dose de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide pour 1 g de protéines. A cette dose en effet nous avons une inhibition totale de la liaison par les protéines sériques des quatre composés mercuriels étudiés précédemment, pour la quantité de 1  $\mu\text{g}$  de Hg par g de protéines. Il est à noter qu'à ce taux de mercure ce n'est pas la nature du composé mercuriel qui intervient mais la concentration en mercure par rapport à un taux défini de protéines. Avec l'augmentation du taux de N-éthyl-maléimide par rapport à cette dose critique de 1,6 mg il apparaît à nouveau une fixation du composé mercuriel par les protéines la quantité de mercure n'ayant pas été modifiée.

Pour le MHP et la Chlormérodine mis directement en présence de sérum sans thioloprive, nous obtenions à la dose de 1  $\mu\text{g}$  de Hg par g de protéines une fixation des composés mercuriels au niveau des  $\alpha$  globulines si la migration électrophorétique était faite avec le tampon de MICHAELIS de pH voisin de 8,6, ou au niveau de l'albumine si la migration était faite avec un tout autre tampon. A partir de 16 mg de thioloprive et pour une même dose de 1  $\mu\text{g}$  de Hg, les composés mercuriels sont à nouveau fixés par plusieurs fractions protéiques. Nous avons observé que même dans ce cas où le N-éthyl-maléimide se trouve sur toutes les protéines nous ne détectons pas de composé mercuriel au niveau de l'albumine après migration électrophorétique en présence de tampon de MICHAELIS. Ceci nous incite à supposer que le MHP et la Chlormérodine se fixaient sur les protéines en présence de ce thioloprive à d'autres sites de liaison que les groupements thiols, ces sites de liaison inconnus subiraient le même sort que les groupements sulfhydriles au cours de la migration électrophorétique en présence du tampon de MICHAELIS. Dans notre discussion générale nous chercherons à développer ce point de vue.

Dans un calcul approximatif, nous montrions que pour la dose de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide tous les groupements SH de l'albumine devaient être bloqués. L'inhibition de la liaison entre 1  $\mu\text{g}$  de Hg et l'albumine nous permettait de supposer que le mercure se fixait bien aux protéines au niveau des groupements thiols libres. Le fait que nous retrouvions de la radioactivité sur les protéines lorsque les quantités de N-éthyl-maléimide augmentent au-delà de 1,6 mg nous permet de penser que d'autres sites de liaison peuvent entrer en jeu soit entre les protéines et le dérivé mercuriel, soit entre le N-éthyl-maléimide et le dérivé mercuriel. Les expériences faites avec des doses croissantes de mercure pour 1,6 mg de thioloprive, ces doses étant toujours rapportées à 1 g de protéines, nous montrent qu'à partir de 10  $\mu\text{g}$  de mercure, nous obten-

nons à nouveau une fixation des composés mercuriels par les protéines comme si tous les groupements sulfhydryliques n'étaient pas bloqués. A moins que d'autres sites de liaison n'interviennent. Nous essayerons d'expliquer ces phénomènes dans notre discussion générale.

CHAPITRE X

---

DISCUSSION GENERALE



Au cours de notre discussion nous allons essayer de dégager éventuellement une relation entre la structure des protéines, les composés mercuriels et la liaison formée entre les deux. Nous devons considérer que les différentes techniques utilisées pour étudier la fixation par les protéines sériques des composés mercuriels nous ont apporté deux types de résultats : les uns obtenus par dialyse, les autres par électrophorèse. En effet la technique de dialyse présente l'intérêt de ne pas provoquer des modifications ni dans la structure des protéines ni dans la liaison établie entre les protéines et les dérivés du mercure. La technique d'électrophorèse nous permet par contre, des résultats plus détaillés sur la nature des protéines jouant le rôle de transporteur. Nous devons tenir compte que de trop nombreux facteurs interviennent au cours de cette technique et peuvent modifier la structure des protéines natives ainsi que la liaison protéine-mercure.

Nous distinguerons donc les résultats obtenus par dialyse de ceux qui sont fournis par l'électrophorèse.

## I - DIALYSE

Par dialyse nous avons pu observer que le MHP et la Chlormérodine, tous deux composés organo-mercuriels, sont totalement fixés à pH = 7,4 par les protéines sériques pour des doses inférieures à 5  $\mu$ g de mercure par g de protéines. Dans les mêmes conditions opératoires et pour les mêmes doses nous avons observé que le chlorure mercurique et l'acétate mercurique n'étaient pas totalement fixés par les protéines sériques.

HUGHES (1947) avait isolé la Mercaptalbumine humaine sous forme de dimère mercurique et avait établi que la stoechiométrie de la réaction était de  $0,5 \text{ Hg}^{2+} / -\text{SH}$ . Dans notre étude nous pouvons supposer que les groupements sulfhydriles des protéines sériques sont saturés si tout le mercure ionisable sous la forme  $\text{HgCl}_2$  ou  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Hg}$  n'est pas fixé, tandis que si la même quantité de mercure est introduite sous la forme de MHP ou de Chlormérodine tous les groupements thiols alors ne sont pas saturés. Dans le cas des composés facilement ionisables, le mercure agit sous la forme du cation  $\text{Hg}^{2+}$ , et, comme l'avait démontré HUGHES, il faut alors deux groupements sulfhydriles pour un cation mercurique. Dans le cas de composés très peu ionisables, il faut deux fois plus de groupements thiols pour fixer la même quantité de mercure car le cation mercurique est alors sous la forme  $\text{R} - \text{Hg}^+$ .

## II - ELECTROPHORESE

Les résultats obtenus à partir de cette méthode de séparation nous ont confirmé que l'étude de la fixation des composés mercuriels par les protéines sériques présentait de nombreuses difficultés dues à des modifications au cours de la migration électrophorétique.

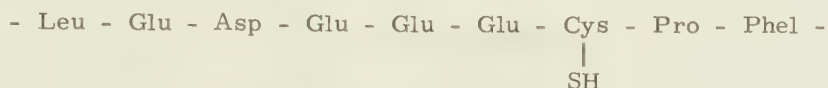
Nous avons observé au cours de nos expériences que ces modifications portant sur la liaison formée entre les protéines sériques et les dérivés mercuriels étaient indépendantes de la nature du sérum. Quel que soit le sérum utilisé, humain ou de lapin, nous avons toujours eu les mêmes résultats. Par contre nous avons remarqué que ces derniers dépendaient de la composition du tampon d'électrophorèse, de la nature des composés mercuriels et se produisaient au niveau de l'albumine. C'est pourquoi notre discussion portera essentiellement sur la structure de l'albumine, la liaison entre cette protéine et les dérivés mercuriels, l'intervention de la migration électrophorétique sur cette liaison, enfin sur l'action d'un thioloprive au niveau de la structure protéique et de la liaison protéine-composé mercuriel.

### A - Liaison de l'albumine aux composés mercuriels

Pour QUERINJEAN (1968) les préparations de sérum-albumine sont hétérogènes selon deux critères principaux : le contenu en thiols et le degré d'agrégation. D'une part la protéine apparaît en partie sous forme de mercaptalbumine et en partie sous forme de non-mercaptalbumine où le thiol est engagé dans un pont disulfure avec la cystéine ou avec le glutathion. D'autre part la protéine se présente en faible quantité sous forme de dimères et de polymères, maintenus ou non par des ponts disulfures. La quantité de ces agrégats augmente en fonction du temps. Si dans la structure de la sérum albumine, les groupements sulphydriles ont un rôle important, il ne faut pas oublier qu'il existe au sein de la molécule de nombreuses chaînes latérales aminées et carboxyliques qui complètent cette structure et dont le rôle est mal connu. Comme nous l'avons développé dans le Chapitre II, la structure tertiaire des protéines est formée à partir de ces chaînes latérales. Celles-ci donnent naissance à des liaisons intramoléculaires, des liaisons covalentes comme les ponts disulfures et un grand nombre de liaisons de faible énergie : liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes, liaisons salines. Ces différentes liaisons confèrent à la structure tertiaire sa stabilité. KAUZMANN (1959) fit un parallèle entre les chaînes latérales des protéines et certaines substances non polaires des hydrocarbures en solutions. En effet les chaînes latérales non polaires ont une très faible affinité pour l'eau et ont tendance à entrer en contact les unes avec les autres pour éviter la phase aqueuse, formant ainsi des sortes de micelles intramoléculaires analogues aux micelles de savons et de détergents dans les solutions aqueuses.

La méthionine et la cystéine sont deux acides aminés suffisamment non polaires pour former des liaisons hydrophobes. La chaîne latérale de la cystéine est semblable à celle de la méthionine en dimension et structure mais sa capacité à participer aux liaisons hydrophobes

est limitée par sa flexibilité plus faible et par les restrictions stériques dues à la présence de deux chaînes primaires auxquelles est rattaché cet acide aminé. Nous pensons que dans le cas de l'albumine sérique, le groupement sulfhydrile libre pouvant réagir avec le mercure est dans une zone hydrophobe et donc peu accessible pour des cations de type  $R - Hg^+$  alors que le cation  $Hg^{2+}$  beaucoup plus petit peut s'y fixer. Nous avons imaginé, connaissant d'après POLONOWSKI (1968) le fragment de chaîne primaire qui entoure dans l'albumine humaine la cystéine porteuse du SH libre de cette protéine :



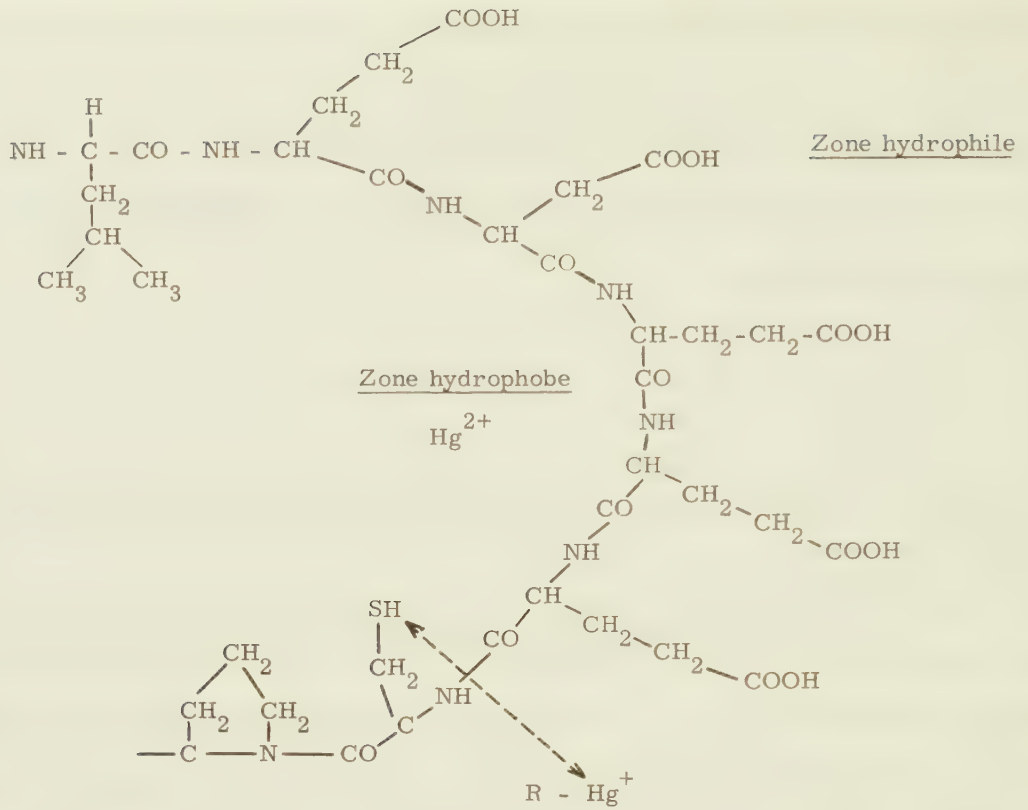
de représenter la zone dans laquelle se trouve le groupement sulfhydrile selon le schéma suivant (figure 46).

Au cours de la migration électrophorétique des dérivés mercuriels seuls nous avons observé (figure 36) que le MHP et la Chlormérodrene ne se décomposaient sensiblement pas, tandis que le chlorure mercurique et l'acétate mercurique se dissociaient. De ces expériences nous avons conclu que la presque totalité du MHP et de la Chlormérodrene devait agir sous la forme  $R - Hg^+$  tandis que la presque totalité des deux sels mercuriques devait agir sous la forme  $Hg^{2+}$ . Ces variations de modifications des composés mercuriels pourraient expliquer pourquoi la liaison entre l'albumine et le chlorure mercurique est irréversible, alors que celle qui est formée entre l'albumine et le MHP est réversible. Si le mercure est sous la forme  $R - Hg^+$  nous supposons que R est trop grand pour permettre à ce cation de pénétrer dans la zone hydrophobe.

La liaison entre l'ion métallique et le groupement SH est alors de nature physico-chimique. Elle est faible et peut être réversible. Si le mercure, par contre, est sous la forme  $Hg^{2+}$  le cation mercurique est assez petit pour pénétrer dans la zone hydrophobe et former avec le groupement SH une liaison chimique irréversible.

#### B - Action de la composition du tampon au cours de la migration électrophorétique sur le transport des composés mercuriels par l'albumine

Cette structure tertiaire peut être très facilement modifiée sous l'action de différents phénomènes, (KARLSON, 1967). Les variations de pH apportent l'accès à des sites de liaison nouveaux ou auxiliaires. Dans le cadre de nos expériences où nous avons toujours opéré en milieu alcalin nous pensons que tous les groupements carboxyliques des chaînes latérales sont bloqués et que seuls les groupements SH et aminés sont disponibles. Une augmentation de charges de la protéines par une augmentation du pH peut accentuer la répulsion électrostatique entre certaines régions dans la molécule et entraîner des ruptures de liaisons inter-chaîne (HUDSON, 1969). Le champ électrique de la migration électrophorétique intervient aussi sur la stabilité de la structure protéique. La mobilité des protéines dépend de leur charge électrique. Elle peut être modifiée



Pour plus de facilité nous avons réduit ce schéma de la façon suivante :

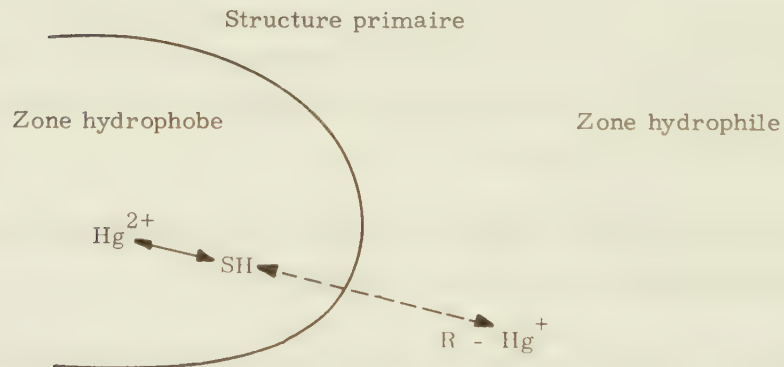


Figure 46 - Fixation des cation  $\text{Hg}^{2+}$  et  $\text{R}-\text{Hg}^+$  à l'albumine.

par les ions présents à la surface du support, par ses propres dimensions et sa forme ainsi que par la force ionique du solvant. Pour TATA (1961) les composants du tampon d'électrophorèse ont aussi une action importante sur la structure des protéines, puisque la charge de celles-ci est déterminée non seulement par l'état d'ionisation des groupements basiques et acides de la protéine, qui est une fonction du pH du milieu, mais aussi par la liaison des ions du tampon autres que des protons de la molécule protéique. KARUSH (1951) avait montré que l'anion du tampon peut entrer en compétition avec la substance liée. PHELPS (1956) avait mis en valeur que la migration électrophorétique de la sérum albumine dépendait de la concentration du tampon acétate dans le support d'électrophorèse. Si l'on substituait Na-Ac - H-Ac par NaCl on augmentait la surface de migration, ce qui correspondrait à une augmentation de charges positives de la protéine. La liaison, se formant entre des systèmes protéiques et la fonction acétate, a pour cet auteur un effet primordial sur la structure protéique.

Par notre étude, nous avons observé que les deux composés organo-mercuriels MHP et Chlormérodrene étaient fixés par l'albumine dans de nombreux cas et que après migration électrophorétique en présence du tampon de MICHAELIS, contenant de l'acétate de Na, dans une zone de pH comprise entre pH = 8,2 et pH = 8,8 ces deux composés mercuriels n'étaient plus fixés par l'albumine mais par les  $\alpha$  globulines. Nous avons observé aussi que la liaison albumine-chlorure mercurique ne subissait aucune modification et que celle qui s'établit entre l'albumine et l'acétate mercurique pouvait présenter quelquefois une très légère modification lors de la migration électrophorétique en présence de tampon acétate. Ces expériences nous confirment que la liaison entre le métal et la protéine dans le cas des composés organo-mercuriels est réversible et donc beaucoup plus faible qu'avec un composé minéral ou un composé organique suffisamment ionisable. Le fait que les solutions de MHP de pH = 8, donc décomposées, aient présenté une liaison irréversible avec l'albumine nous montre que dans ce cas le mercure n'agissait plus sous la forme  $R-Hg^+$  mais bien sous la forme  $Hg^{2+}$ .

La reprise des éluats obtenus après chromatographie sur colonne de Séphadex, en vue d'une électrophorèse nous a permis de vérifier que cette rupture de la liaison établie entre l'albumine et le cation  $R-Hg^+$  ne se produisait qu'en présence de tampon acétate de pH = 8,6 et au cours de la migration électrophorétique.

Lors de l'étude de la liaison du MHP par certains acides aminés isolés dont la cystéine, nous avons pu observer que le fait d'inclure l'acide aminé dans une chaîne peptidique était très important pour que la liaison entre le composé mercuriel et l'acide aminé se produise. La constante d'association du groupement sulfhydrile si la cystéine est isolée a pour valeur  $pK = 8,6$  si cet acide est situé dans une chaîne peptidique et au voisinage d'un groupement carboxylique la valeur du  $pK$  devient égale à 10 (TONNELAT, 1968). Nous pouvons supposer que l'acétate de sodium qui modifie la structure de l'albumine au cours de la migration électrophorétique, dans une zone de pH où nous avons observé une inhibition de la liaison entre l'albumine et le cation  $R-Hg^+$ , modifie suffisamment le  $pK$  du groupement sulfhydrile pour provoquer la

rupture de la liaison  $R - Hg \dots S - Cyst$ . Le cation  $R - Hg^+$  ainsi libéré serait alors fixé par les premières protéines qu'il rencontre sur le support électrophorétique, c'est-à-dire les  $\alpha$  globulines. Parmi les  $\alpha$  globulines, il existe une  $\alpha_2$  globuline portant un groupement SH libre. Cette globuline est normalement présente en petite quantité, son rôle est inconnu (BURTON et GRABAR, 1967). Il est possible que ce soit elle qui fixe le cation mercurique.

La traînée de mercure que nous observons quelquefois entre l'albumine et les  $\alpha$  globulines confirmerait notre hypothèse. La présence d'eau rendrait la liaison  $R - Hg^+ \dots S - Cyst - Alb$  encore plus fragile et plus facile à rompre en présence de tampon acétate puisque les solutions de MHP au centième permettent d'éviter cette trace de mercure entre les  $\alpha$  globulines et l'albumine.

#### C - Action d'un thioloprive sur la liaison formée entre les protéines sériques et les composés mercuriels

L'étude de l'action du N-éthyl-maléimide comme thioloprive sur la liaison formée entre les composés mercuriels et les protéines sériques nous a permis de constater que ce composé se fixait sur toutes les protéines. Aux doses les plus faibles on le trouvait lié à l'albumine, à des doses plus élevées on le trouvait lié aux autres protéines (figure 40). Sa fixation par les protéines n'intervenait pas sur leur migration électrophorétique et n'était pas modifiée par la composition des différents tampons.

La quantité de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide déterminée grossièrement pour que tous les groupements thiols de l'albumine et des autres protéines soient bloqués, nous a permis de vérifier que 1  $\mu g$  de mercure, qu'il soit sous la forme  $R - Hg^+$  ou  $Hg^{2+}$ , n'était plus fixé par aucune protéine et ceci quelles que soient les conditions d'électrophorèse. Pour cette quantité de 1  $\mu g$  de mercure, si nous augmentons la quantité de thioloprive nous observons que le mercure se fixait à nouveau aux protéines : à l'albumine d'abord si la migration électrophorétique était faite en présence de tampon véronal, aux  $\alpha$  globulines, si la migration électrophorétique était faite en présence du tampon de MICHAELIS et si le mercure se trouvait sous la forme  $R - Hg^+$ . Si nous augmentons la quantité de mercure, pour la dose constante de 1,6 mg de N-éthyl-maléimide, nous observons quel que soit le composé mercuriel, une nouvelle fixation de ceux-ci par les protéines, comme si le thioloprive n'avait pas bloqué tous les groupements thiols. Nous observons aussi le phénomène d'inhibition entre l'albumine et le cation  $R - Hg^+$  au cours de la migration électrophorétique en présence du tampon de MICHAELIS.

L'ensemble de ces expériences nous a permis de supposer que le N-éthyl-maléimide devait intervenir sur la structure des protéines natives, sans pour cela les dénaturer. Il est possible qu'une faible quantité de ce thioloprive suffise à bloquer les groupements sulfhydriles libres des protéines sans trop perturber la structure native. Ceci nous confirmerait l'hypothèse d'une liaison du mercure au niveau des groupements thiols. Des quantités croissantes de N-éthyl-

maléimide par contre peuvent modifier suffisamment la structure native en détruisant certaines liaisons formant la structure tertiaire et rendre ainsi accessible au mercure d'autres sites de liaisons, en particulier des groupements aminés. Il nous paraît peu probable que la présence d'un excès de N-éthyl-maléimide puisse rompre les liaisons covalentes des ponts disulfures pour libérer de nouveaux groupements SH. Ce phénomène d'ouverture de certaines liaisons de la structure tertiaire pourrait expliquer que nous ayons observé une fixation du mercure lorsque l'on augmentait les quantités de N-éthyl-maléimide. Le fait que nous ayons eu en présence de 1,6 mg de ce thioloprive une fixation par les protéines de doses de mercure supérieures à 1 µg nous confirme que même à cette dose de 1,6 mg, la structure native des protéines est suffisamment perturbée pour permettre au cation mercurique  $\text{Hg}^{2+}$  ou  $\text{R} - \text{Hg}^+$  d'accéder à d'autres sites de liaisons que les groupements thiols. Pour KLOTZ (1962) les cations à poids égal sont moins liés que les anions par la sérumalbumine. Dans le cas de nos expériences ce phénomène ne peut intervenir car l'atome de Hg a un poids moléculaire de 200, très supérieur à celui de la molécule de N-éthyl-maléimide égal à 125. Il est possible que cette perturbation que nous avons observée soit due à l'excès de Hg qui déplacerait le composé organique par équilibre selon la loi d'action de masse.

Malgré la présence de N-éthyl-maléimide nous avons toujours obtenu une inhibition de la liaison Hg-Albumine au cours de la migration électrophorétique en présence de tampon de MICHAELIS de pH = 8,6. Ce phénomène nous confirme dans l'hypothèse de PHELPS (1956) que l'acétate de sodium doit modifier profondément la structure de l'albumine et ceci beaucoup plus que ne le fait le N-éthyl-maléimide.

Cette modification de la structure de la protéine par l'acétate de sodium au niveau de l'albumine doit être importante et doit porter sur des sites de liaisons très précis puisqu'elle n'empêche pas la protéine de fixer un composé organique comme le N-éthyl-maléimide. Mais en présence de ce thioloprive qui selon notre hypothèse permet l'accès de nouveaux sites de liaison elle ne permet pas la fixation du mercure sous la forme  $\text{R} - \text{Hg}^+$  par l'albumine. SINGER (1968) montra que les protéines ont des sites actifs dans lesquels l'activité est augmentée par rapport à d'autres sites du même type. Les causes de cette augmentation d'activité sont mal connues mais la proximité de certains groupes ou un micro-environnement spécial de ces sites actifs peuvent en être la raison. Inversement cet auteur montra que certains groupes perdent leur activité par dénaturation ou simple ouverture de la protéine sans qu'il y est dénaturation. Cette simple ouverture peut être due à la présence d'un seul ion ou d'une molécule.

Dans la réaction métal-protéine on considère la molécule réagissant avec le métal comme le Ligand. Les nombres de coordination des ions métalliques sont habituellement supérieurs à 1 et caractéristiques du métal plutôt que du Ligand. Dans le cas du mercure le nombre de coordinance est 2 dans la majorité des cas mais peut aller jusqu'à 4. Pour la protéine nous savons que les groupements des chaînes latérales ont un rôle beaucoup plus important dans la formation de liaisons avec des ions métalliques que les groupes terminaux. Alors que la protéine

native porte de nombreux groupes Ligands susceptibles de se fixer à un ion métallique, STEINHART (1964) observe qu'en général un seul de tous ces Ligands se combine au métal. Ce phénomène est dû à l'orientation spatiale des Ligands dans la structure de la protéine native les uns par rapport aux autres ainsi que de leur différentes constantes d'association. De plus les molécules d'eau complètent les possibilités de coordinance de l'ion métallique alors que de nombreux Ligands disponibles pourraient eux aussi compléter ces possibilités. Dans le cas de notre étude, il est nécessaire de porter notre attention d'abord sur la structure plutôt que sur l'aspect fonctionnel des sites actifs, car la représentation du complexe site-métal est statique et rigide. C'est une extrapolation. D'une part les groupements individuels des résidus d'acides aminés sont capables de mouvements rotationnels qui les rendent plus ou moins accessibles au cation  $Hg^{2+}$ , d'autre part la conformation des sites actifs et leur relative orientation vers le cation métallique sont probablement sujets à des propriétés d'équilibre qui apportent des fluctuations. Pour ces raisons l'adhérence trop rigide à une géométrie concrète du complexe formé entre le site actif et le cation métallique n'est pas justifié dans l'état actuel de nos connaissances sur la structure et les fonctions des protéines.

## C O N C L U S I O N

Dans des conditions les plus voisines possibles des conditions physiologiques, nous avons montré par dialyse que les composés mercuriels étaient fixés par les protéines sériques, et que au-delà de 10  $\mu$ g de Hg nous observions une saturation. Pour opérer de façon à ne pas rompre la liaison protéine-mercure et afin de mieux connaître la nature des protéines qui fixaient les composés mercuriels, nous avons utilisé la séparation des protéines par chromatographie sur colonne de Séphadex G. 200. Cette méthode de séparation nous a permis de constater que les composés mercuriels étaient surtout fixés par les Albumines et les  $\alpha$  globulines. En très faible quantité on en trouvait aussi sur les  $\gamma$  globulines et les  $\beta$  globulines. Enfin pour mieux connaître les protéines transportant les composés mercuriels nous avons pris la technique de séparation des protéines par migration électrophorétique. Ces deux dernières expériences nous ont permis de constater que ce transport des composés mercuriels par les protéines sériques se produit toujours par les mêmes protéines, mais que la liaison entre les protéines et les dérivés organo-mercuriels peu ionisables était suffisamment faible pour être modifiée au cours de la migration électrophorétique et sous l'influence d'un tampon de composition définie. Par contre la liaison établie entre les protéines et les dérivés mercuriels facilement ionisables n'était pas modifiée au cours de l'électrophorèse quel que soit le tampon utilisé.

Aussi pensons-nous que le transport des dérivés mercuriels par les protéines sériques se fait toujours par les mêmes protéines mais que la nature de la liaison varie selon l'état d'ionisation du mercure qui peut se présenter sous la forme  $R - Hg^+$  ou  $Hg^{2+}$ . Cette modification de la liaison pourrait expliquer les différentes fixations des composés mercuriels par les protéines.



BIBLIOGRAPHIE

- [ 1 ] - AZEN E.A., JENSEN L.  
Effects of halides on binding of trace concentration of mercury to human erythrocytes.  
Brit. J. Haemat. 1968, 14, 653-667.
  
- [ 2 ] - ARONSSON T., GRONWALL A.  
Improved separation of serum proteins in paper electrophoresis. A new electrophoresis buffer.  
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1957, 9, 338-341.
  
- [ 3 ] - BACQ Z.M., CHEYMOL J., DALLEMAGNE M.J.  
Pharmacodynamie Biochimique.  
Masson, Paris, 1961, 976-980.
  
- [ 4 ] - BARRE R., LABAT J.  
Emploi de l'acide phytique pour séparer les protéines diluées des milieux biologiques et pour déterminer leurs groupements cationiques : Application au liquide céphalo-rachidien.  
Ann. Biol. Clin. 1959, 17, 309-330.
  
- [ 5 ] - BERNAL J.D.  
Structure arrangements of macromolecules.  
Discuss. Faraday Soc., 1958, 25, 7-18.
  
- [ 6 ] - BLAU M., BENDER M.A.  
Radiomercury ( $^{203}\text{Hg}$ ) labeled Neohydrin. A new agent for brain tumor localisation.  
J. Nucl. Med., 1962, 3, 83-93.



- [ 7 ] - BORGHGRAEF R.R.M., KESSLER R.H., PITTS R.F.  
Plasma regression, distribution and excretion of radiomercury in relation to diuresis following the intravenous administration of <sup>203</sup>Hg labelled Chlormerodrin to the dog.  
J. Clin. Invest., 1956, 35, 1055-1065.
- [ 8 ] - BOYER P.D.  
Spectrophotometric study of the reaction of proteins SH group with organic mercurials.  
J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 4331-4337.
- [ 9 ] - BOYER P.D.  
Sulfhydryl and disulfide groups of enzymes.  
in BOYER P.D., LARDY H., MYRBACK K.  
The enzymes  
Acad. Press, New York, 1959, 1, 511-586.
- [10] - BROWN P.R.  
Reactions of disulfide with mercuric ions.  
Biochemistry, 1969, 8, 1200-1202.
- [11] - BROWN R.A., TIMASHEFF S.N.  
Effect buffers on electrophoresis.  
in BIER M.  
Electrophoresis : theory, methods and applications.  
Acad. Press, New York-London, 1959, 1, 318-324.
- [12] - BULL H.B.  
An introduction to physical biochemistry.  
Davis Philadelphia, 1964, 64-83.
- [13] - BURTIN P., GRABAR P.  
Nomenclature and identification of the normal human serum proteins.  
in BIER M.  
Electrophoresis : theory, methods and applications.  
Acad. Press, New York-London, 1967, 2, 110-152.

- [ 14 ] - CAFAUNY E. J. , FARAH A.  
Effects of the mercurial diuretic, Mersalyl, on the concentration of protein-bound  
sulfhydryl in the cytoplasm of dog kidney cells.  
J. Pharmacol. Exp. Ther. , 1956, 117, 101-105.
- [ 15 ] - CARDINALE A. , SIMONE G. F.  
The use of sulfhydryl containing drugs of chelating agents to reduce renal irradiation  
during <sup>203</sup>Hg - Chlormerodrin scintigraphy.  
J. Nucl. Biol. Med. , 1969, 12, 121-127.
- [ 16 ] - CECIL R.  
Intramolecular bonds in proteins : the role of sulfur in proteins.  
in NEURATH H.  
The proteins.  
Acad. Press, New-York, 1963, 1, 380-466.
- [ 17 ] - CEMBER H. , GALLACHER P. , FAULKNER A.  
Distribution of mercury among blood fractions and serum proteins.  
Am. Ind. Hyg. Ass. J. , 1968, 29, 233-237.
- [ 18 ] - CROLL M. N. , BRADY L. W.  
A new agent for splenic scanning (BMHP).  
Radiology, 1965, 84, 492-495.
- [ 19 ] - DESGREZ P.  
Transport function of plasma proteins.  
Proceeding of the symposium on the transport function of plasma proteins. Paris, 1965  
Elsevier  
Amsterdam-London-New York (1966).
- [ 20 ] - DREVON B. , FOURNIER Ch. , DONIKIAN R.  
Mise en évidence de la fixation et du transport de certains médicaments par les  
protéines du sérum.  
Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 1955, 94, 177-183.
- [ 21 ] - EARLEY L. E.  
Organo mercurials.  
New England J. Med. , 1967, 276, 967-968.

- [ 22 ] - EDELHOCH H., KATCHALSKI  
Dimerisation of serum mercaptalbumine in presence of mercurials : kinetic and equilibrium studies with mercurials salts.  
J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 5058-5072.
- [ 23 ] - EDSALL J. T., MAYBURY R. H.  
Dimerisation of serum mercaptalbumine in presence of mercurials : studies with a bifunctional organic mercurial.  
J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 3131-3138.
- [ 24 ] - ELLIS R. J.  
Sulfur metabolism : The usefulness of N-ethyl-maleimide.  
Nature, 1966, 211, 1266-1268.
- [ 25 ] - ERWIN V. G., PEDERSEN P. L.  
A sensitive gel filtration method for determination of proteins sulfhydryl groups with <sup>14</sup>C-Chloromercuribenzoate.  
Anal. Biochem., 1968, 25, 477-485.
- [ 26 ] - FISHER J.  
Der hentige Stand der Milzdiagnostik mit radioactiven Isotopen.  
Progress in radiology XI th. Int.  
Congress of radiology, Rome, 1965.  
Excerpta medica foundation, Rome, 1967, 2, 1216-1226.
- [ 27 ] - FLEURY P., COURTOIS J., EBERHARD R.  
Dosage pondéral des protéines sériques : Etude critique et nouvelle technique.  
Bull. Soc. Chim. Bio., 1951, 33, 1900-1906.
- [ 28 ] - FLODIN P., KILLANDER J.  
Gel filtration of serum proteins.  
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 63, 403-410.
- [ 29 ] - FRIEDMAN E.  
Mitosis of chick fibroblats in the presence of unsaturated imides and sulfhydryl compound.  
Biochim. Biophys. Acta, 1952, 9, 61-69.

- [ 30 ] - FRIEDMAN H. L.  
Relationship between chemical structure and biological activity in mercurial compounds.  
Ann. N. Y. Acad. Sci., 1957, 65, 461-470.
- [ 31 ] - GELOTTE B., FLODIN P., KILLANDER J.  
Fractionation of human plasma proteins by gel filtration and zone electrophoresis or ion-exchange chromatographie.  
Arch. Biochem. and Biophys., 1962, supplement 1, 319-326.
- [ 32 ] - GRABAR P., WILLIAMS C. A.  
Methode immuno-électrophorétique d'analyse de mélanges de substances antigéniques.  
Biochimica Biophysica Acta, 1955, 17, 67-74.
- [ 33 ] - GREGORY J. D.  
The stability of N-ethyl-maleimide and its reaction with sulfhydryl groups.  
J. Amer. Chem. Soc., 1955, 77, 3922.
- [ 34 ] - GUILLOT M. H.  
Les liaisons contractées par les protéines avec les corps transportés.  
Ann. Biol. Clin., 1967, 25, 71-80.
- [ 35 ] - GURD N., WILCOX W.  
Metal-proteins systems.  
in ANSON M. L., BAILEY K., EDSALL J. T.  
Advance in protein chemistry.  
Academic Press, New-York, 1956, 11, 364-400.
- [ 36 ] - HELLERMAN L., CHINARD F. P., DEITZ V. R.  
Proteins sulfhydryl groups and the reversible inactivation of the enzyme urease.  
J. Biol. Chem., 1943, 147, 443-462.
- [ 37 ] - HUDSON R. A.  
Solvent facilitated proton transfer in hydrogen bound complexes of proton donor and acceptor groups in model proteins systems.  
Bioch. Biophys. Acta, 1969, 181, 353-360.

- [ 38 ] - HUGHES W. L.  
An albumine fraction isolated from human plasma as a crystalline mercuric salt.  
J. Am. Chem. Soc. 1947, 69, 1836-1837.
- [ 39 ] - JANDL J. H., SIMMONS R. L.  
The agglutination and sensitization of red cells by metallic cations. Interactions  
between multivalent metals and the red cell membrane.  
Brit. J. Haemat., 1957, 3, 19-23.
- [ 40 ] - JANSON J. C.  
Adsorption phenomena on sephadex.  
J. Chromato. 1967, 28, 12-20.
- [ 41 ] - JANOT M. M., LEBEAU P.  
Pharmacie chimique  
Masson, Paris, 1955, III, 2334-2360.
- [ 42 ] - KARLSON P.  
Introduction to modern biochemistry.  
Academic Press, New-York-London, 1967, 51-56.
- [ 43 ] - KARUSH F.  
The study of protein binding by partition analysis : The effect of protein charge.  
J. Amer. Chem. Soc. 1951, 73, 1246-1252.
- [ 44 ] - KAUZMANN W.  
Denaturation of proteins and enzymes.  
in Mc ELROY W. D., GLASS B.  
The mechanism of enzyme action.  
John Hopkins, Baltimore, Maryland, 1954, 70-110.
- [ 45 ] - KAUZMANN W.  
Some factors in the interpretation of protein denaturation.  
in ANFINSEN C. B., ANSON M. L., BAILEY K.  
Advance in proteins chemistry.  
Academic Press, New York, London, 1959, 14, 1-57.
- [ 46 ] - KESSLER R. H., LOZANO R., PITTS R. F.  
Studies on structure diuretic activity relationships of organic compounds of mercury  
J. Clin. Invest. 1957, 36, 656-668.

- [47] - KLOTZ I. M., BURKHARD R. K., URQUHART J. M.  
The binding of organic ions by proteins : Comparison of bovine and human serum albumin.  
J. Phys. Chem., 1952, 56, 77-85.
- [48] - KOSHLAND D. E.  
Biological specificity in protein-small molecule interactions.  
Proc. First. Intern. Pharm. Meeting, 1963, 7, 161-195.
- [49] - LIGHT A., SMITH E. L.  
Amino acid analysis of peptides and proteins.  
in NEURATH H.  
The proteins.  
Academic Press, New York, 1963, 1, 1-39.
- [50] - LINDERSTROM-LANG K. U.  
Proteins and enzymes.  
Stanford Univ., Stanford California, 1952.
- [51] - Mc AFEE J. G., WAGNER H. N.  
Visualization of renal parenchyme by scintiscanning with  $^{203}\text{Hg}$ -Neohydrin.  
Radiology, 1960, 75, 820-821.
- [52] - Mc AFEE F. G., SUBRAMANIAN G.  
Compounds of radiomercury.  
in FREEMAN L. M., JOHNSON P. H.  
Clinical scintillation scanning.  
New York, Evanston, London, 1969, 74-77.
- [53] - MIKES O.  
Chromatographic methods.  
Van Nostrand, London, 1966, 316-331.
- [54] - NEMETHY G., SHERAGA H.  
The structure of water and hydrophobic bonding in proteins. III The thermodynamic properties of hydrophobic bounds in proteins.  
J. Phys. Chem. 1962, 36, 1773-1779.

- [ 55 ] - PANNETIER P.  
Chimie physique générale.  
Atomistique, liaisons chimiques et structures moléculaires.  
Masson, Paris, 1969, 503-506.
- [ 56 ] - PARMENTIER C., ASKIENAZY S.  
Scintigraphies hépatique et splénique.  
in PAGET M., HARTMANN L.  
Les isotopes : applications biocliniques  
L'Expansion Scientifique Française, Paris, 1967, 83-115.
- [ 57 ] - PASCAL P.  
Nouveau Traité de Chimie Minérale.  
Masson, Paris, 1962, V, 907-910.
- [ 58 ] - PUTNAM F.W.  
Structure and function of the plasma proteins.  
in NEURATH H.  
The proteins  
Academic Press, New York, 1965, III, 153-268.
- [ 59 ] - PAULING L., COREY R.B., BRANDSON H.R.  
Structure of proteins.  
Proc. Natn. Acad. Sci. USA, 1951, 37, 205-208.
- [ 60 ] - PHELPS R.A., CANN J.R.  
The effect of ion binding on protein structure : Influence of acetate on the  
electrophoretic behaviour of serum albumin.  
J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 3539-3540.
- [ 61 ] - PITTS R.F., SARTORIUS O.W.  
Mechanism of action and therapeutic use of diuresis.  
Pharmacol. Rev., 1950, 2, 161-226.
- [ 62 ] - POLONOWSKI J.  
Biochimie médicale.  
Masson, Paris, 1968, 3, 62.

- [ 63 ] - PORATH J., FLODIN P.  
Gel filtration.  
in PETERS H.  
Protides of biological fluids.  
Elsevier, Amsterdam, 1963, X, 290-297.
- [ 64 ] - QUERINJEAN P., PREAUX G., LONTIE R.  
Etude chromatographique de la dimérisation de la sérum albumine bovine par le mercure.  
Bull. Soc. Chim. Biol., 1968, 50, 1949-1965.
- [ 65 ] - ROSA U., BIANCHI G.  
Marcatura del Neohydrin con  $^{203}\text{Hg}$  e  $^{197}\text{Hg}$  e studio del suo comportamento biologico.  
Minerva Nucleare, 1963, 7, 511-514.
- [ 66 ] - ROTHSTEIN A.  
Cell membrane as site of action of heavy metals.  
Fed. Proc., 1959, 18, 1026-1028.
- [ 67 ] - ROUSSELET F.  
Technique d'immunoelectrophorèse.  
in GIRARD M. L.  
Problèmes de biochimie appliquée.  
Masson, Paris, 1967, 286-291.
- [ 68 ] - ROUSSELET J. P.  
Contribution à l'étude pharmacologique du transport des colloïdes d'or radioactifs par le sang et les excudats séreux.  
Thèse Doct. Pharmacie, Paris, 1966.
- [ 69 ] - SAND J., HOFMANN K. A.  
Einwirkung von Propylen und Butylen auf Mercurisalze.  
Berlin Deutsch. Chem. Ges., 1900, 33, 1353-1358.
- [ 70 ] - SCATCHARD G., HUGHES W. L., GURD F. R. N.  
The interaction of proteins with small molecules and ions.  
in GURD F. R. N.  
Chemical specificity in biological interactions.  
Academic Press, New York, 1954, 193-218.

- [ 71 ] - SCHERAGA H.  
Intramolecular bonds in proteins.  
II. Non covalent bonds  
in NEURATH W. L.  
The proteins  
Academic Press, New York, 1963, 1, 477-590.
- [ 72 ] - SHAROFF H. A. , MARK H. J.  
Polarographic analysis of the serum albumin mercury and zinc complexes.  
J. Am. Chem. Soc. , 1953, 75, 1420-1426.
- [ 73 ] - SHULMAN A.  
Metal chelates in biological systems.  
in DWYER P. P. , MELLOR D. P.  
Chelating agents and metal chelates.  
Academic Press, New York, London, 1964, 383-435.
- [ 74 ] - SINGER S. J.  
Covalent labeling of actives sites.  
in ANFINSEN C. B. , ANSON M. L.  
Advances in protein chemistry.  
Academic Press, New York, 1967, 22, 1-51.
- [ 75 ] - SMITH E. L. , KIMMEL J. R. , BROWN D. M.  
Crystalline papain. II Physical studies ; the mercury complex.  
J. Biol. Chem. , 1954, 207, 533-549.
- [ 76 ] - SMITH E. L. , KIMMEL J. R. , BROWN D. M.  
Isolation and properties of cristalline mercury derivative of a lysozyme from  
papaya latex.  
J. Biol. Chem. , 1955, 215, 67-83.
- [ 77 ] - SMITHIES O.  
Molecular size and starch-gel electrophoresis.  
Arch. Biochem. Biophys. , 1962, supplement 1, 125-131.
- [ 78 ] - SMYTH D. G. , NAGAMATSU A.  
Some reactions of N-ethyl-maleimide.  
J. Am. Chem. Soc. , 1960, 82, 4600-4604.

- [ 79 ] - STEINHARD J., BEYCHOK S.  
Interaction of divalent metal ions with proteins.  
in NEURATH W. L.  
The proteins  
Academic Press, New York-London, 1964, II, 264-276.
- [ 80 ] - TANAKA A., URAKUBO G.  
Rapid, synthesis of  $^{203}\text{Hg}$ -labeled Chlormerodrin.  
Chem. Pharm. Bul. Jap., 1968, 16, 2084-2086.
- [ 81 ] - TATA J. R., WIDNELL C. C., GRATZER W. B.  
A systematic study of factors affecting the binding of thyroxin and related substances to serum proteins.  
Clin. Chim. Acta, 1961, 6, 597-612.
- [ 82 ] - TATI M.  
The behaviour of mercury in the blood.  
Proc. XIV Intern. Congr. Occup. Health  
Excerpta Medica Foundation, Amsterdam, 1964, 968-970.
- [ 83 ] - THREEFOOT S. A., RAY C. T., BURCH G. E.  
Concentration time course in the plasma of man of radiomercury introduced as a mercurial diuretic.  
J. Clin. Invest., 1949, 28, 661-669.
- [ 84 ] - TONNELAT J.  
Biophysique.  
Masson, Paris, 1968.
- [ 85 ] - TRISTAM G. R., SMITH R. H.  
Amino acid composition of certain proteins.  
in NEURATH W. L.  
The proteins.  
Academic Press, New York, 1963, I, 46-51.
- [ 86 ] - VINCENT P. C., BLACKBURN C. R. B.  
The effects of heavy metals ions on the human erythrocytes. Comparisons of the action of several heavy metals.  
Aust. J. Exp. Biol., 1958, 36, 471-482.

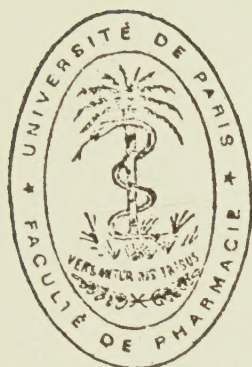
- [ 87 ] - WAGNER H. N., WEINER I. M.  
1- Mercury-2-Hydroxypropane (MHP)  
Arch. Int. Med., 1964, 113, 696-701.
- [ 88 ] - WEBB J. L.  
Enzyme inhibitors.  
in DIXON M., WEBB E. C.  
Enzymes  
Academic Press, New York, 1964, 2, 315-360.
- [ 89 ] - WEED R., EBER J., ROTHSTEIN A.  
Interaction of mercury with human erythrocytes.  
J. Gen. Physiol., 1962, 45, 395-410.
- [ 90 ] - WEED R., ROTHSTEIN A.  
Localisation of erythrocytes membrane sulfhydryl groups essential for glucose transport.  
J. Gen. Physiol., 1965, 48, 617-692.
- [ 91 ] - WEINER I. M., MULLER O. H.  
A polarographic study of Mersalyl (Salyrgan)-thiol complex and of excreted products of Mersalyl.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1955, 113, 241-249.
- [ 92 ] - WEINER I. M., LEVY R. I., MUDGE G. H.  
Studies on mercurials diuresis : Renal excretion, acid stability and structure-activity relationship of organic mercurials.  
J. Pharmacol. Exp. Ther., 1962, 138, 96-112.
- [ 93 ] - WELIN L.  
Fixation des médications par les protéines plasmatiques.  
Thèse Pharmacien (Etat), Paris, 1964.
- [ 94 ] - WILLIAMS C. A., CHASE M. W.  
Cellulose acetate membrane (CAM) electrophoresis.  
in WILLIAMS C. A.  
Methods in immunology and immunochemistry.  
Academic Press, New York, London, 1968, II, 20-25.

- [ 95 ] - WUHRMANN F., WUNDERLY Ch.  
Les protéines du sang humain.  
Flammarion, Paris, 1961.
  
- [ 96 ] - WUNDERLEY C.  
Principles and applications of paper electrophoresis.  
Elsevier, Amsterdam, 1961.
  
- [ 97 ] - YON J.  
Structure et dynamique conformationnelle des protéines.  
Hermann, Paris, 1969.

*Manuscrit reçu le 3 Novembre 1970*

Vu  
et Permis d'Imprimer  
Paris, le 15 juin 1970  
le Doyen,

P. MALANGEAU



*P. Malangeau*





